

SEQUENZANALYSE VON PROTEINEN

Primärstruktur der Hämoglobine
vierer Vertreter der Carnivora:

Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)

Kleiner Panda (*Ailurus fulgens*)

Kragenbär (*Ursus tibetanus*)

Malaienbär (*Helarctos malayanus*)

und

Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685

Ottmar Hofmann

SEQUENZANALYSE VON PROTEINEN

Primärstruktur der Hämoglobine vierer Vertreter der Carnivora:

Panda	(<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)
Kleiner Panda	(<i>Ailurus fulgens</i>)
Kragenbär	(<i>Ursus tibetanus</i>)
Malaienbär	(<i>Helarctos malayanus</i>)

und

Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ottmar Hofmann
aus München
1986

1.Referent: Prof. Dr. G. Braunitzer
2.Referent: Prof. Dr. Th. Severin
Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.1986

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Herstellung der Versuchsanordnung

2.2. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.1. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.2. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.3. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.4. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.5. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.6. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.7. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.8. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.2.9. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.1. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.2. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.3. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.4. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.5. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.6. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.7. Beschreibung der Versuchsanordnung

2.3.8. Beschreibung der Versuchsanordnung

3. ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE 1. UND 2.

3.1. Ergebnisse der Versuchsreihe 1.

3.2. Ergebnisse der Versuchsreihe 2.

3.3. Ergebnisse der Versuchsreihe 3.

3.4. Ergebnisse der Versuchsreihe 4.

3.5. Ergebnisse der Versuchsreihe 5.

3.6. Ergebnisse der Versuchsreihe 6.

Meiner Inge

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A : EINLEITUNG	1
B : MATERIAL UND METHODEN	3
1. Untersuchungen an Bärenhämoglobinen	3
1.1. Isolierung der Globinketten	3
1.1.1. Gewinnung der Hämoglobinlösungen	3
1.1.2. Häm-Spaltung	4
1.1.3. Trennung der α - und β -Ketten	4
1.1.3.1. Ionenaustauscher	4
1.1.3.2. HPLC	5
1.1.4. Elektrophoresen	5
1.1.4.1. Disk-Elektrophorese	5
1.1.4.2. Triton-Elektrophorese	6
1.1.5. Oxidation	6
1.2. Spaltung der α - und β -Ketten	6
1.2.1. Tryptische Spaltung	6
1.2.2. Chemische Spaltung	7
1.2.3. Trennung der Peptide	7
1.2.3.1. Gelchromatographie	7
1.2.3.2. HPLC	7
1.2.4. Prüfung der Reinheit der Peptide	8
1.2.4.1. Dünnschicht-Elektrophorese	8
1.2.4.2. Analysen	9
2. Untersuchung des α -Amylase-Inhibitors Z-2685	10
2.1. Isolierung des Inhibitors	10
2.2. Prüfung der Reinheit	10
2.3. Komplex Inhibitor-Schweine- α -Amylase	10
2.4. Spaltungsmethoden	11
2.4.1. Enzymatische Spaltungen	11
2.4.1.1. Tryptische Spaltung	11

2.4.1.2. Peptische Spaltung	12
2.4.1.3. Thermolytische Spaltung	12
2.4.2. Chemische Spaltung	12
2.5. Trennung der Peptide	12
2.5.1. Gelchromatographie	12
2.5.2. HPLC	12
2.6. Hydrazinolyse	13
2.7. Massenspektrometrie	13
 3. Sequenzanalyse	 13
 C : ERGEBNISSE	 16
 4. Sequenz der vier Hämoglobine	 16
4.1. Kettentrennung	16
4.2. Ursus tibetanus (Kragenbär)	19
4.2.1. Tryptische Spaltung der nativen α -Ketten	19
4.2.2. Tryptische Spaltung der oxidierten α -Ketten	23
4.2.3. Auswirkung der Oxidation auf Tryptophan	24
4.2.4. Tryptische Spaltung der β -Ketten	28
4.2.5. Chemische Spaltung der α -Ketten	32
4.3. Ailuropoda melanoleuca (Panda)	34
4.3.1. Tryptische Spaltung der α -Ketten	34
4.3.2. Tryptische Spaltung der β -Ketten	37
4.4. Ailurus fulgens (Kleiner Panda)	40
Tryptische Spaltung der α - und β -Ketten	
4.5. Helarctos malayanus (Malayenbär)	43
Tryptische Spaltung der α - und β -Ketten	
 5. Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685	 51
5.1. Isolierung und Prüfung auf Reinheit	51
5.2. Spaltungsmethoden und Sequenzbestimmung	53
5.2.1. Tryptische Spaltung	53
5.2.2. Sequenz der tryptischen Peptide	55
5.2.3. Peptische Spaltung	56

5.2.4. Thermolytische Spaltung	56
5.2.5. Sequenz der thermolytischen Peptide	61
5.2.6. FAB-Spektren der thermolytischen Peptide	62
5.2.7. Asp-Pro-Spaltung	64
 D : DISKUSSION	 70
6. Struktur und Funktion des Hämoglobins	70
6.1. Bindungsstellen von Deoxy-Hämoglobinen	71
6.2. Vergleich mit abnormalen menschlichen Hämoglobinen	74
7. Einordnung der Pandas und Systematik der Raubtiere (Carnivora)	75
7.1. Evolution der Globin-Gene	77
7.2. Molekularbiologische Interpretation der Sequenzen	80
7.3. Vergleich mit der paläontologischen Datierung	81
7.4. Mathematische Auswertung der Sequenzen mit der maximum parsimony Methode	82
7.5. Zusammenfassung und Diskussion der Daten	85
7.6. Identische Hämoglobine	86
8. α -Amylase-Inhibitor Z-2685	87
8.1. Protein-Inhibitoren der α -Amylase	87
8.2. Die Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685	88
8.3. Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor	90
8.3.1. Bildung des Komplexes	90
8.3.2. Tertiärstruktur der Säuger- α -Amylasen	91
8.4. Homologie zwischen Inhibitor und Enzym	93
8.5. Inhibitor : Produkt einer Genduplikation des eigenen Enzyms	94
8.6. Genetik und Evolution der α -Amylase	95
8.7. Biologische Funktion des Inhibitors	96
 E : ZUSAMMENFASSUNG	 97
F : LITERATUR	99

ABKÜRZUNGEN

AMP	: Adenosinmonophosphat
B	: Acetonitril
CM-	: Carboxymethyl-
DEAE-	: Diethylaminoethyl-
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
2.3.-DPG	: D-2.3.-Diphosphoglycerat
DTE	: Dithioerythrit
FAB	: fast atom bombardment
FMN	: Flavinmononukleotid
Hb	: Hämoglobin
H-NMR	: ^1H -Kernresonanz
HPLC	: Hochdruckflüssigchromatographie
IR	: Infrarotspektrum
KCN	: Kaliumcyanid
$\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN}))_6$	: Kaliumhexacyanoferrat(III)
NaAc	: Natriumacetat
NAD	: Nicotinadenindinukleotid
NH_4Ac	: Ammoniumacetat
Polybren	: Polymer aus 1.3.-Dibrompropan u. 2.4.Diaminohexan
PTH	: Phenylthiohydantoin
P_{50}	: Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins in Pascal
Quadrol	: N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)- ethylendiamin
RP	: reversed phase
SP-	: Sulfopropyl-
TFA	: Trifluoressigsäure
Th	: thermolytisches Peptid
$\text{TosPheCH}_2\text{Cl}$	: (N-Tosyl-L-phenylalanyl)chlormethan
Tp	: tryptisches Peptid
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

A. EINLEITUNG

Die Sequenzanalyse von Proteinen und insbesondere von Hämoglobinen lieferte wesentliche Erkenntnisse zum Verständnis vieler Phänomene auf den Gebieten der Biochemie, der Molekularbiologie und der Genetik. In diesem Zusammenhang sei die Entdeckung der Genduplikation und die Aufklärung der molekularen Ursache der Sichelzellanämie erwähnt.

Die Protein-Sequenzanalyse wurde in den letzten Jahren durch DNA-Sequenztechniken unberechtigterweise etwas in den Hintergrund gedrängt. Durch zahlreiche Verbesserungen in der Identifizierung der PTH-Aminosäuren, aber nicht in der Methodik der Edman Chemie in den letzten Jahren wurden Untersuchungen im Nanomol-Bereich ermöglicht. Die Protein-Sequenzierung bleibt wichtig, auch deshalb, weil bestimmte Probleme über die DNA-Sequenzierung nur schwer oder nicht gelöst werden können.

Im ersten Teil der Arbeit werden zur biochemischen Charakterisierung des Großen Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) und des Kleinen Panda (*Ailurus fulgens*) vergleichende Untersuchungen der Hämoglobine von zwei weiteren Bären (Kragenbär: *Ursus tibetanus* und Malaienbär: *Helarctos malayanus*) durchgeführt. Hierbei wurden die Hämoglobine komplett analysiert und die Sequenz der jeweils 287 Aminosäuren bestimmt. Diese umfassenden Hb-Daten ermöglichten eine genaue Einordnung der Pandas in die Systematik der Carnivora (Raubtiere).

Der zweite Teil der Arbeit betrifft die Primärstruktur eines α -Amylase-Inhibitors aus Streptomyceten. Diese Verbindungsklasse ist von Interesse für die Behandlung von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus. Darüber hinaus tragen diese sekundären Metaboliten dazu bei, den Wirkmechanismus von α -Glucosidasen verstehen zu lernen.

Probleme der Arbeit lagen in der Resistenz des Inhibitors gegenüber enzymatischem Abbau und in der Bestimmung der Disulfidbrücken. Die einzelnen Spaltmethoden mußten daher sorgfältig ausgearbeitet werden. Auch hier wurde versucht, die Mengen an Material so weit wie möglich zu reduzieren.

Die ungewöhnliche Sequenz des Inhibitors erlaubte eine Angabe des aktiven Zentrums im Ring A. Die mathematische Analyse der Sequenz zeigte Homologie zur α -Amylase; es wird gefolgert, daß Inhibitoren Produkte der Duplikation des Gens des eigenen Enzyms sind.

B : MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungen an Bärenhämoglobinen

1.1. Isolierung der Globinketten

1.1.1. Gewinnung der Hämoglobinlösungen

Ca. 8 ml Blut wurden aus der Vene von vier Bären entnommen: einem Panda, einem Malaienbären (beide aus dem Berliner Zoo), einem Kragenbären (aus dem Frankfurter Zoo) und einem Kleinen Panda (aus dem Zoo Helsinki). Zur Verhinderung der Koagulation waren die Blutproben mit Heparin versetzt.

Die Proben wurden bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, um das Plasma abzutrennen. Die zähe Erythrozytenlösung wurde mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9 m NaCl) gewaschen und bei -68°C aufbewahrt.

Die Erythrozyten wurden durch Zugabe von Wasser (1:1 v/v) hämolysiert. Die geplatzen Membranen wurden durch Zentrifugation entfernt und der Rückstand aus Zellfragmenten zur quantitativen Extraktion des Hämoglobins mehrmals mit Wasser gewaschen. Die vereinigten, klaren Hb-Lösungen standen für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung. Um den Gehalt an Hämoglobin zu bestimmen, wurde mit Cyanidionen ligandiert und so eine stabile Form des Hb erhalten⁽¹⁾.

Je 0.02 ml Hb-Lösung wurden mit 4 ml Transformationslösung (0.16% $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ und 0.16% KCN in Wasser) versetzt. Nach 15 Minuten wurde die Extinktion des Komplexes bei 540 nm gemessen.

In 10 ml Hb-Lösung befanden sich 900 mg Hämoglobin (9%).

1.1.2.Häm-Spaltung

-Rossi-Fanelli⁽²⁾

990 ml Aceton p.A. und 10 ml 37 % HCl wurden im Erlenmeyerkolben auf -18°C abgekühlt; unter heftigem Rühren wurden 10 ml Hb-Lösung (= 900 mg Hb) langsam zugetropft. Nach 30 Minuten bei 0°C hatte sich das Globin als weißer Niederschlag abgesetzt, das Häm sich im braunen Überstand gelöst. Dieser wurde vorsichtig abgezogen und das Globin mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen; anschließend wurde in Wasser aufgenommen, gegen 0.1 N Essigsäure dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute an Globin betrug 600 mg (66%).

-Teale⁽³⁾

Die Hb-Lösung wurde mit 0.5 N HCl auf pH 2 eingestellt und mit dem doppelten Volumen an Methylethylketon im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die wässrige Phase enthielt Globin, das wie eben beschrieben weiter aufgearbeitet wurde.

1.1.3.Trennung der α - und β -Ketten

1.1.3.1.Ionenaustauscher⁽⁴⁾

Die Trennung erfolgte auf CM 52 Cellulose mit 8 M Harnstoff, 0.05 M NaAc und 0.01 % DTE als Puffer (eingestellt mit HCl^{conc.} auf pH 5.8). 100 mg Globin und 30 mg DTE wurden in 5 ml Puffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte erst mit diesem Puffer; nach 30 Minuten wurde die NaCl-Konzentration linear auf 0.07 M gesteigert (siehe Legende zu Abb.2).

Die Entsalzung der Ketten erfolgte auf Sephadex G25 medium mit 1 N Essigsäure als Elutionsmittel.

Säulenlänge	: 150 cm
Säulendurchmesser	: 2.5 cm
Durchfluß	: 300 ml/Std.

1.1.3.2.HPLC

Bei allen Trennungen wurde am Beckman Gradient Liquid Chromatograph Model 334, Controller 421 gearbeitet. Als Pumpen wurden Beckman 110A und 100A, als UV-Photometer Biotronik BT 3030 und als Schreiber Shimadzu C-R1A verwendet. Es wurde bei 220 nm, 230 nm und 280 nm detektiert.

Die Säulen (Fa. Knauer, Bad Homburg: 250 mm x 4.6 mm, analytische Säulen, 250 mm x 8 mm präparative Säulen) wurden mit einem Shandon Packgerät (Fa. Gynkotheek, München) selbst gefüllt.

Maximal 1.2 mg Hb wurden mit 0.02 ml 0.1% TFA versetzt und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf Nucleosil 300-7 C₄ (Macherey&Nagel) getrennt. Als Elutionsmittel fanden Gradienten aus 0.1% TFA und Acetonitril Anwendung.

1.1.4.Elektrophoresen

1.1.4.1.Disk-Elektrophorese⁽⁵⁾

Unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurde im Alkalischen die Anzahl der Hb-Komponenten des Bärenblutes ermittelt. Das 10% Polyacrylamidgel setzte sich wie folgt zusammen:

4.5% Tris/1 N HCl, 0.06% N,N'-Tetramethyldiamin, 10% Acrylsäureamid, 0.16% N,N'-Methylenbisacrylsäureamid und 0.035% Ammoniumperoxodisulfat.

Die entlüftete Mischung wurde vorsichtig in Glasröhrchen (7.5 cm x 0.5 cm) pipettiert. Nach einer Stunde war die Polymerisation beendet.

Aufgetragen wurden jeweils 0.02 mg Hb. Die Elektrophorese dauerte 1 Std. bei einer Stromstärke von 4.5 mA pro Gel-Röhrchen. Als Elektrophorese-Puffer diente 0.07 M Tris/Glycin (pH 8.3). Die Proteinbanden wurden mit 10% Amidoschwarz-(10 B) angefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte mit 7% Essigsäure durch Diffusion.

1.1.4.2. Triton Elektrophorese⁽⁶⁾

Unter denaturierenden Bedingungen wurde im Säuren die Anzahl der Ketten des Hb bestimmt. Das Polyacrylamidgel, das Triton X-100 als neutrales Detergens enthielt, setzte sich folgendermaßen zusammen:

12% Methylenbisacrylamid, 5% Eisessig, 0.5% Tetramethylethylen-diamin, 48% Harnstoff, 2% Triton X-100 und 0.04% Ammoniumperoxodisulfat.

Der Ansatz wurde entlüftet und sofort in Glasröhrchen (siehe 1.1.5.1.) pipettiert. Die Polymerisation war nach 16 Std. beendet.

Jeweils 0.02 mg Globin bzw. Ketten, versetzt mit 0.05 ml Probenpuffer (40.4% Harnstoff, 8.3% Eisessig und 8.3% β -Mercaptoethanol), wurden aufgetragen.

Als Elektrodenpuffer diente 5% Essigsäure. Die Elektrophorese lief 4 Std. bei 140 Volt, die Anfärbung erfolgte wie in 1.1.4.1. beschrieben.

1.1.5. Oxidation⁽⁷⁾

Jeweils 10 mg α - bzw. β -Ketten wurden mit 0.35 ml 10% Perameisensäure 15 Minuten bei 0°C oxidiert. Die Säure wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Globin lyophilisiert.

1.2. Spaltung der α - und β -Ketten

1.2.1. Tryptische Spaltung^(7,8)

Die Bedingungen der Originalvorschrift wurden folgendermaßen modifiziert: je 10 mg native bzw. oxidierte Ketten wurden bei pH 10.8 in verdünntem Ammoniak gelöst und 2 Std. mit 2% Trypsin (TosPheCH₂Cl-behandelt, Worthington, EC 3.4.21.4.) bei Raumtemperatur gespalten; nach 2 Std. wurde der pH-Wert auf 9.0 gesenkt und erneut 2% Trypsin zugegeben. Nach insgesamt 4 Std. wurde die Reaktion durch Titration auf pH 3.5 beendet. Das Core, das bei pH 6.7 ausgefallen war, wurde durch Zentrifugation abgetrennt und

bei -68°C , die löslichen Peptide bei 0°C aufbewahrt.

1.2.2. Chemische Spaltung⁽⁹⁾

10 mg native Ketten wurden einer säurehydrolytischen Spaltung der Asp-Pro-Bindung in 6 M Guanidin/70% Ameisensäure unterzogen (66 Std. bei 42°C).

1.2.3. Trennung der Peptide

1.2.3.1. Gelchromatographie

Die löslichen tryptischen Peptide wurden auf Sephadex G25 fine getrennt. Die Proben wurden in Volumina ≤ 2 ml per Hand aufgetragen.

Die Trennung des Prolyl-Peptids wurde auf Sephadex G50 fine durchgeführt.

Die genauen Bedingungen sind den Legenden der Abbildungen zu entnehmen.

Die Entsalzung des Prolyl-Peptids erfolgte an Biogel P2 mit 10% Ameisensäure als Eluens.

Säulenlänge	:	92 cm
Säulendurchmesser	:	1.6 cm
Durchfluß	:	34 ml/Std.

1.2.3.2. HPLC⁽¹⁰⁾

Die tryptischen Peptide wurden direkt bzw. nach Trennung auf Sephadex G25 fine (siehe 1.2.3.1.) auf reversed phase Säulenmaterialien getrennt. Im einzelnen wurden folgende Umkehrphasen benutzt:

LiChrosorb RP 2 (Merck, Darmstadt) mit 0.05 M Ammoniumacetat oder 0.1% TFA als wässrige Phase.

LiChrosorb RP 18 (Merck, Darmstadt) mit 0.1% TFA,

Vydac RP 18 weitporiges Material (Macherey&Nagel) mit 0.1% TFA.

Als organische Phase wurde Acetonitril (im Text abgekürzt mit B) verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei 230 nm und 220 nm.

Abgestimmt auf das jeweilige Trennproblem wurden verschiedene Gradienten-Programme ausgearbeitet. Die einzelnen Gipfelfraktionen wurden lyophilisiert.

Die tryptischen Peptide der β -Ketten des Panda-Hb wurden zusätzlich auf TSK-Gel, Typ G 2000 SW (Tojo Soda, 600mm x 4.6mm) mit 0.1% TFA getrennt.

1.2.4. Prüfung der Reinheit der Peptide

1.2.4.1. Dünnschicht-Elektrophorese

Die Wanderung der Peptide im elektrischen Feld gemäß ihrer mittleren Ladung bei pH 5.4 wurde untersucht.

DC-Fertigplatten: Cellulose 10x20 cm, Schichtdicke 0.1 mm (Merck, Darmstadt).

Puffer : 5% Pyridin, 5% Aceton, Wasser, pH 5.4 (mit Essigsäure eingestellt).

Das Anfärben der Peptide erfolgte mit Ninhydrin (60% abs. Ethanol, 20% Eisessig, 8% Collidin, 0.1% Ninhydrin)⁽¹¹⁾. Um bestimmte Seitenketten nachzuweisen, wurden spezifische Farbtests durchgeführt:

Test auf Arginine⁽¹²⁾ :

0.02% Phenanthrenchinon in Ethanol und 10% NaOH (alkoholisch 60%) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Arginine ergaben im UV-Licht Fluoreszenz (=Phenanthrenchinonreaktion).

Test auf Tryptophan⁽¹³⁾ :

die Platte wurde mit 1% Dimethylaminobenzaldehyd in 90 ml Aceton und 10 ml HCl_{conc} besprüht. Rotfärbung zeigte Tryptophan an .

Test auf Tyrosin und Histidin⁽¹⁴⁾ :

Lösung A (1% Sulfanilsäure in 90 ml Wasser und 10 ml HCl_{conc.}), Lösung B (5% Natriumnitrit) und gesättigte Sodalösung wurden im Verhältnis 1:1:2 gemischt. Histidin ergab rotbraune, Tyrosin rote Flecken.

1.2.4.2. Analysen

Die Bruttoformel⁽¹⁵⁾ wurde durch Hydrolyse von jeweils 2 nmol Peptid mit 5.7 N HCl bei 110°C im Vakuum bestimmt (20 bzw. 200 Std.). Mit TFA/HCl_{conc.} (1:2 v/v) wurde alternativ 30 Minuten bei 166°C hydrolysiert⁽¹⁶⁾. Tryptophan-haltige Peptide wurden in Gegenwart von 6% Thioglycolsäure⁽¹⁷⁾, Methionin- bzw. Cystein-haltige Peptide nach Oxidation mit Perameisensäure⁽⁷⁾ bestimmt.

Das Hydrolysat wurde im automatischen Aminosäure-Analysator der Firma Biotronik, LC 5000 getrennt. Das Säulenmaterial bestand aus einer sulfonierten Polystyrolmatrix. Die Proben wurden in Citratpuffer (pH 2.2) gelöst und mit diskontinuierlichen pH- (fünf Puffer von pH 3.54 bis pH 10.5) und Temperatur- (von 48°C bis 70°C) Gradienten eluiert. Zuerst wurden saure Aminosäuren, die bei diesem pH keine Wechselwirkung mit dem Träger eingehen können, und später bei steigendem pH basische Aminosäuren mit Ninhydrin detektiert. Die Regenerierung der Säule nach jedem Analysenlauf erfolgte mit 0.3 N NaOH.

2. Untersuchung des α -Amylase-Inhibitors Z 2685

2.1. Isolierung des Inhibitors

Der α -Amylase-Inhibitor Z-2685 wurde nach einem patentierten Verfahren aus der Kulturflüssigkeit von *Streptomyces parvulus* FH-1641 (ATCC 31209) gewonnen⁽¹⁸⁾. Reinigung erfolgte an DEAE-Sephadex A25 und SP-Sephadex in 8 M Harnstoff (pH 3.1). Der Inhibitor kristallisierte in Ammoniumsulfat bei pH 7.

2.2. Prüfung der Reinheit

Je 0.03 mg Inhibitor wurden elektrophoretisch untersucht. Bei der Triton-Elektrophorese wurde ein 9% Methylenbisacrylamid-Gel verwendet. Die übrigen Bestandteile der Gele waren wie unter 1.1.4.1. und 1.1.4.2. beschrieben ausgewählt. Die Dauer der Triton⁽⁶⁾- und Disk⁽⁵⁾-Elektrophorese betrug 3 Std. bzw. 0.5 Std.. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue⁽¹⁹⁾, die Entfärbung mit 60% Methanol- 5% Eisessig durch Diffusion. Die unterste Nachweisgrenze lag bei 1 nmol Inhibitor.

2.3. Komplex Inhibitor-Schweine- α -amylase

2 nmol (0.113 mg) pankreatische Schweine- α -amylase und 3 nmol (0.024 mg) Inhibitor Z-2685 wurden in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.7) 2 Minuten inkubiert. Die Komplexbildung wurde mit der Flachbett-Disk-Elektrophorese (Gelzusammensetzung siehe 1.1.4.1.) überprüft (Geldimensionen : 12 x 15 x 0.1 cm) (3 Std. bei 30 mA, 350 Volt). Die Färbung erfolgte wie in 2.2. beschrieben.

2.4. Spaltungsmethoden

2.4.1. Enzymatische Spaltungen

Um die Abhängigkeit der Spaltungsausbeute von Temperatur, Säurekonzentration und Einwirkzeit des Enzyms abschätzen zu können, wurden Tests mit 0.8 mg (100 nmol) Inhibitor und 3% Pepsin angesetzt. Als Lösungsmittel dienten 10% und 20% Ameisensäure bzw. Essigsäure. Bei einem Testansatz wurde der Inhibitor vor der Spaltung 15 Minuten bei 70°C denaturiert. Jeweils nach 15, 30, 45 Minuten, weiter nach jeder halben Stunde und zuletzt nach 24 Std. wurden Proben von 2 nmol entnommen und chromatographisch untersucht. Als Fließmittel diente n-Butanol : Pyridin : 0.1N Essigsäure (4:5:4); die Platten wurden zweimal entwickelt. Die Laufzeit betrug insgesamt 3 Std., die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin (siehe 1.2.4.1.).

Disulfid-Brücken wurden wie folgt nachgewiesen⁽²⁰⁾:

Reagens I: 5% Natriumcyanid und 5% Natriumcarbonat gelöst in 25% Ethanol.

Reagens II: 2% Nitroprussid-Natrium gelöst in 75% Ethanol.

I und II wurden 1:1 gemischt. Disulfide ergaben rote Flecken.

2.4.1.1. Tryptische Spaltung

5 mg oxidiertes Inhibitor (Oxidationsbed. siehe 1.1.5.) wurden in verdünntem Ammoniak gelöst (pH 8.9). Je 0.2 mg Trypsin wurden zu Beginn und nach 90 Minuten zugegeben. Nach 3 Std. wurde die Reaktion durch Titration auf pH 3.5 beendet. Das bei pH 7 ausgefallene Core wurde abzentrifugiert und bei -68°C, der lösliche Anteil bei 0°C aufbewahrt.

2.4.1.2. Peptische Spaltung⁽²¹⁾

Das C-terminale Peptid (Tp 3), das bei der tryptischen Spaltung isoliert wurde, wurde 15 Minuten mit 3% Pepsin A (EC 3.4.23.1) bei pH 3.5 nachgespalten.

2.4.1.3. Thermolytische Spaltung⁽²²⁾

5 mg nativer Inhibitor wurden bei pH 8.0 und 53°C eine Stunde mit 0.1 mg Thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus* neutrale Proteinase, EC 3.4.24.4) gespalten. Der Ansatz wurde auf pH 3.5 titriert und bei 0°C aufbewahrt.

2.4.2. Chemische Spaltung^(9,23)

5 mg nativer Inhibitor wurden einer säurehydrolytischen Spaltung der Asp-Pro-Bindung in 70% Ameisensäure unterzogen (68 Std. bei 42°C).

2.5. Trennung der Peptide

2.5.1. Gelchromatographie

Die Trennung erfolgte auf Sephadex G25 fine mit 0.1 N Essigsäure als Elutionsmittel. Die Methode fand für die thermolytischen Peptide und das Hydrolysat der Asp-Pro-Spaltung Anwendung.

2.5.2. HPLC

Die löslichen Peptide des tryptischen Ansatzes, die thermolytischen Peptide der einzelnen Gipfelfractionen der Sephadex-Trennung (siehe 2.5.1.) und die peptischen Peptide wurden auf RP 2 LiChrosorb mit 0.05 M NH_4Ac , das Core-Peptid der tryptischen Spaltung mit 0.1% TFA als wässrige Phase getrennt.

Das Prolyl-Peptid wurde nach Reinigung über Sephadex (siehe 2.5.1.) auf Vydak RP 18 analysiert.

2.6. Hydrazinolyse⁽²⁴⁾

1 mg Inhibitor wurden mit wasserfreiem Hydrazin bei 80°C fünf Stunden hydrolysiert. Überschüssiges Hydrazin wurde mit Benzaldehyd entfernt. Die Hydrazide der Aminosäuren wurden mit Diethylether extrahiert und die wässrige Phase analysiert.

2.7. Massenspektrometrie

Mit den Massenspektrometern CH7A und MAT312 (Firma Varian/Finnigan, Bremen), die mit dem Datensystem SS200/NS gekoppelt waren, wurden von PTH-Aminosäuren Elektronenstoß-Massenspektren⁽²⁵⁾ (70eV) und von Peptiden FAB-- (fast atom bombardment)⁽²⁶⁾ Spektren (2kV) aufgenommen.

3. Sequenzanalyse

Die Sequenzen wurden in automatischen Flüssigphasen-Sequenzatoren (Fa. Beckman, Typen 890 B, 890 C und 890 C II) nach Edman und Begg⁽²⁷⁾ und teilweise im Gasphasen-Sequenzator⁽²⁸⁾ bestimmt. Es wurden jeweils 30-50 nmol Peptid abgebaut (im Gasphasen-Sequenzator 1 nmol). Im Flüssigphasen-Sequenzator kamen zwei Programme zur Anwendung:

Quadrol-Programm: als Kupplungspuffer diente 0.25 M Quadrol^(27, 29). Es wurde angewendet bei kleinen Lysylpeptiden, wobei die Lysine mit Reagens IV = 7-(Isothiocyanato)naphtalin-1,3,5,- trisulfonsäure, Na-Salz⁽³⁰⁾ blockiert wurden.

Propin-Programm: als Kupplungspuffer diente 1.25 M Diethylamino propin^(29,31), pH 9.0. Es wurde für Arginylpeptide, lange hydrophobe Peptide und hydrophile Peptide bis 4 Aminosäuren angewendet. Lange hydrophobe Peptide wurden mit Reagens I = 4-(Isothiocyanato)-benzolsulfonsäure, Na-Salz⁽³²⁾ umgesetzt. Die Peptide des Inhibitors wurden unter Zugabe von 1 mg Polybrene abgebaut⁽³³⁾.

Konversion erfolgte im Autokonverter (Sequemat P-6, Kontron Technik GmbH) mit 3 M TFA bei 60°C bzw. manuell bei 80°C.

Die PTH-Derivate der Aminosäuren (ca. 1 nmol) wurden über HPLC analysiert. Es kamen zwei Elutionssysteme zur Anwendung:

I : Stufengradientenelution⁽³⁴⁾ (HPLC:1084B Liquid Chromatograph, Fa. Hewlett Packard)

Säule : ODS-Hypersil (RP 18), Shandon; 4.6 mm x 250 mm

Flußrate : 1.2 ml/min. bei 60°C

Puffer A : 10 mM Ammoniumacetat, pH 4.8

Puffer B : Acetonitril

Stufengradient : Start mit 10% B

nach 1 Min. 20% "

" 5 " 45% "

" 14 " 70% "

" 19 " 10% "

Detektion erfolgte bei 265 nm mit multichromatischem Licht gegen 330 nm. Dabei ergaben Ser und Thr negative Gipfel.

II : Isokratische Elution⁽³⁵⁾ (Säule siehe System I) bei 60°C

Puffer : 0.0685% 0.01 M Natriumacetat (pH 5.2)

0.0315% Acetonitril

0.5% Dichlorethan

Flußrate : 1.7 ml/min.

Detektion erfolgte bei 265 nm, von Ser und Thr bei 330 nm.

C : E R G E B N I S S E

4. Sequenz der vier Hämoglobine

Die Blutproben waren freundlicherweise von Dr. H. Jalanka (Helsinki, Kleiner Panda), Dr. R. Gölthenboth (Berlin, Panda und Malaienbär) und Dr. R. Faust (Frankfurt, Kragenbär) zur Verfügung gestellt worden. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Abschnitt 1.1.1. der Methoden beschrieben.

4.1. Kettentrennung

Die Disk-Elektrophorese (siehe 1.1.4.1.) zeigte bei allen vier Hämoglobinen eine Komponente. Die Triton-Elektrophorese zeigte jeweils zwei Globinketten mit nur geringen Unterschieden in der Lage der Banden. Die α -Ketten wanderten 25% weiter als die β -Ketten (Abb.1).

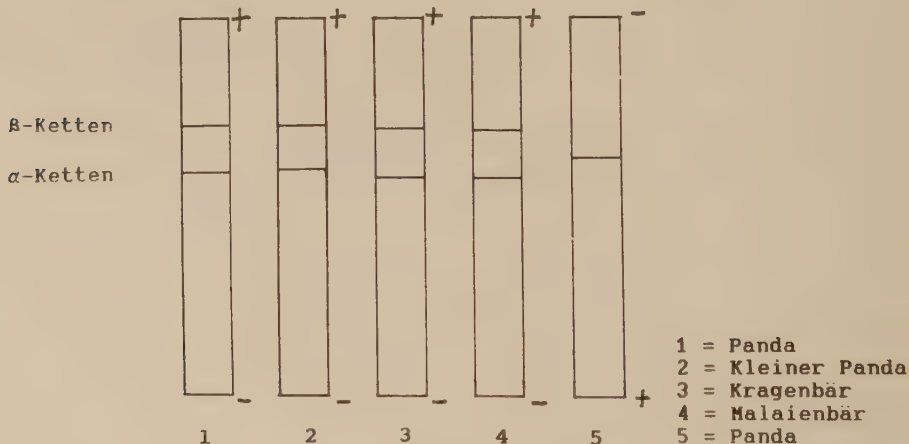


Abb.1: Triton- (Bahnen 1-4) und Disk- (Bahn 5) Elektrophoresen

Zwei Verfahren wurden gewählt, um saubere α - bzw. β -Ketten zu isolieren. Die konventionelle Methode war die chromatographische Trennung mit CM-Cellulose (siehe 1.1.3.1.) und 8M Harnstoff als denaturierendem Agens. In Abb.2 wird die Trennung des Pandaglobins gezeigt. Die Globine von Kleinem Panda, Kragenbär und Malaienbär lieferten annähernd identische Bilder.

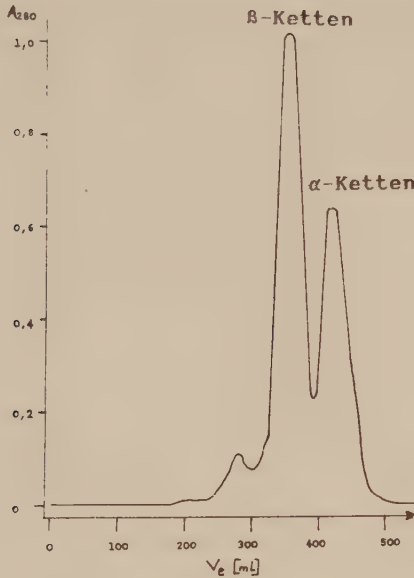


Abb.2: Kettentrennung des Pandaglobins an CM 52 Cellulose
 Säulenlänge : 19 cm (Durchmesser 2.5cm)
 Elutionsmittel : 8M Harnstoff, 0.05 M NaAc, 0.01% DTE, pH 5.8
 Gradient : 0.07M NaCl (linear)
 Flußrate : 36 ml/Std.

Der Vorteil dieser Methode ist die große Kapazität: es können bis zu 200 mg Globin getrennt werden, wobei die Reinheit der Ketten (nach Auswahl geeigneter Bedingungen wie pH und Salzgradient) sehr hoch war (auf der Triton-Elektrophorese können noch ca. 10% Verunreinigungen durch andere Ketten nachgewiesen werden). Die Ausbeute an α - und β -Ketten betrug jeweils 70%.

Der zweite Weg war die Trennung über HPLC (siehe 1.1.3.2.). Dieses Verfahren wurde beim Blut des Malaienbären angewendet. Mit dem in Abb.3 gezeigten Gradienten-Programm konnten sehr saubere Ketten isoliert werden.

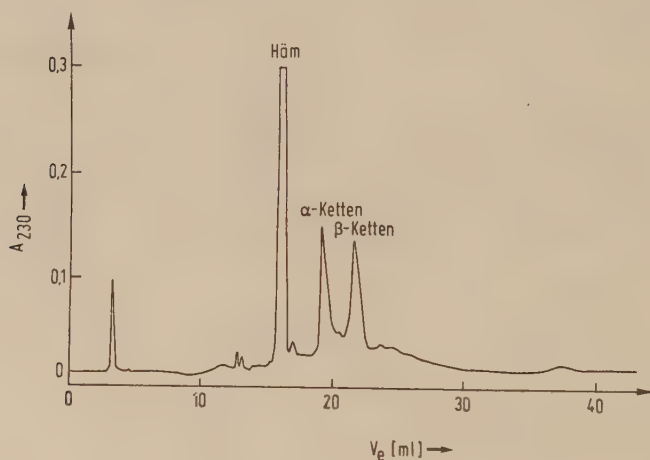


Abb.3: Kettentrennung des Hb des Malaienbären über HPLC.

Säule : Nucleosil 300-7 C₄ (Macherey & Nagel)

wässrige Phase : 0.1% TFA

Gradient : 0-40% B in 5 Minuten

40-60% B " 30 "

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, mußten alle Bedingungen genau eingehalten werden. Vorteile dieses Verfahrens sind Schnelligkeit und Leistungsfähigkeit der Trennung; die Hb-Lösung konnte ohne vorherige Abspaltung der prosthetischen Häm-Gruppe eingespritzt werden. So konnte ein zeitaufwendiger Schritt der Aufarbeitung entfallen. Pro Lauf konnten aber nur maximal 1.2 mg Hämoglobin getrennt werden und mit einer präparativen Säule waren die Bedingungen nur schwer reproduzierbar; dabei waren die Elutionsgipfel relativ breit.

4.2. Ursus tibetanus (Kragenbär)

4.2.1. Tryptische Spaltung der nativen α -Ketten

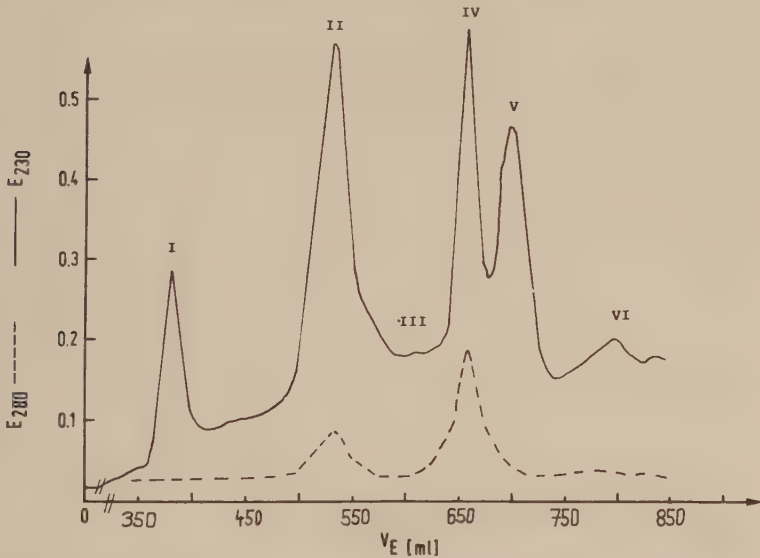


Abb.4: Trennung der tryptischen Peptide auf Sephadex G25 fine
 Säulenlänge : 142 cm (Durchmesser 2.5 cm)
 Elutionsmittel : 0.1N Essigsäure
 Flußrate : 20 ml/Std.

Die Bedingungen wurden wie in 1.2.1. beschrieben ausgewählt. Die Dauer der Spaltung betrug 4 Stunden, um auch schwer hydrolysierbare Peptid-Bindungen zwischen Tp 12 und Tp 13 zu öffnen. Die anderen Bindungen waren nach 2 Stunden gespalten. Obwohl die Konzentration des Enzyms hoch war, konnte keine chymotryptische Nebenaktivität nachgewiesen werden.

Der Spaltansatz wurde wie unter 1.2.3.1. beschrieben getrennt (Abb.4).

In jeder Gipfelfraktion wurden über die Elektrophorese (siehe 1.2.4.1.) mindestens zwei Peptide nachgewiesen. Sie mußten über HPLC getrennt werden (Abb.5-10).

Bis auf Tp 12 und Tp 13 konnten alle Peptide direkt isoliert werden.

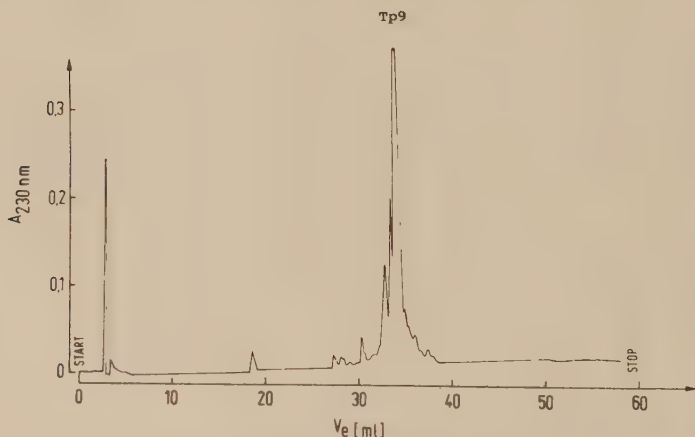


Abb.5: HPLC von Gipfel I der Abb.4.

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac
 Flußrate : 1.5 ml/min.
 Gradient : 0-40% B in 40 Minuten
 40-60% B " 10 "

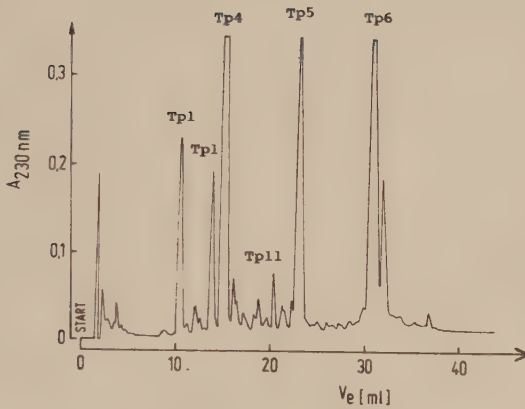


Abb.6: HPLC von Gipfel II der Abb.4.
Bedingungen siehe Abb.5.

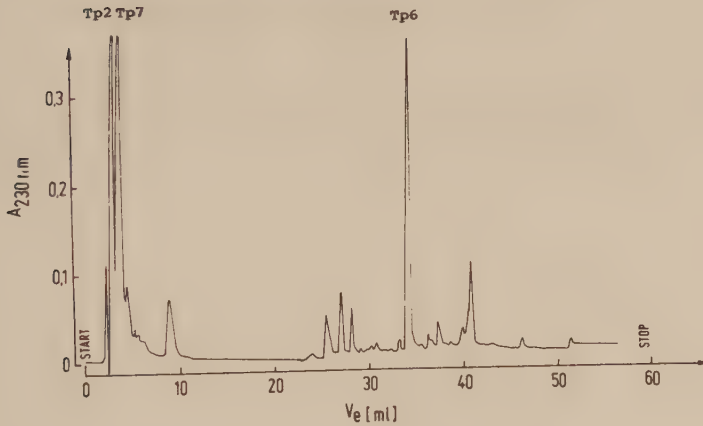


Abb.7: HPLC von Gipfel III der Abb.4.
Bedingungen siehe Abb.5.

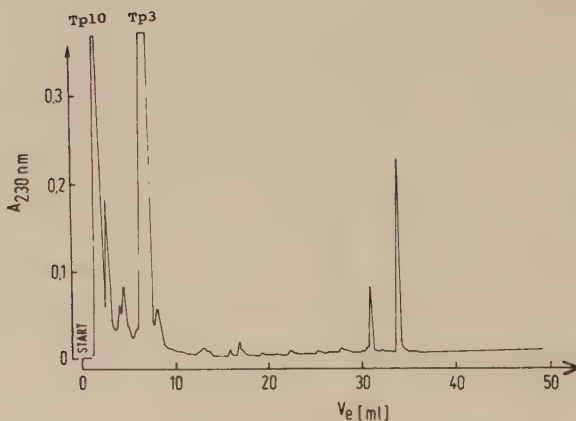


Abb.8: HPLC von Gipfel IV der Abb.4.

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH₄Ac
 Flußrate : 1.5 ml/min.
 Gradient : 10 Minuten isokratisch
 : 0-35% B in 20 Minuten
 : 35-60% B " 10 "

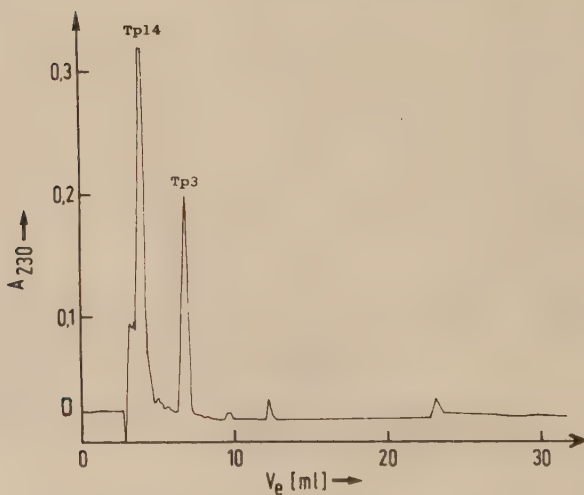


Abb.9: HPLC von Gipfel V der Abb.4.
Bedingungen siehe Abb.8.

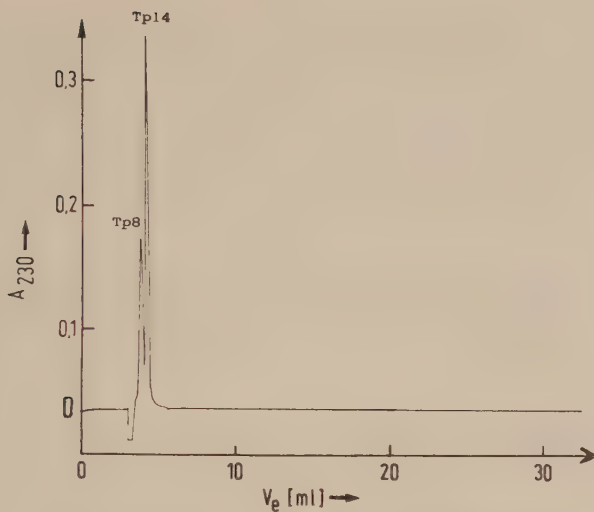


Abb.10: HPLC von Gipfel VI der Abb.4.
Bedingungen siehe Abb.8.

4.2.2. Tryptische Spaltung der oxidierten α -Ketten

Die nach 1.1.5. oxidierten α -Ketten wurden tryptisch gespalten und über HPLC getrennt. Aus den löslichen Peptiden wurde Tp 12 (keine Abbildung), aus dem Core Tp 13 (Abb.11) isoliert.

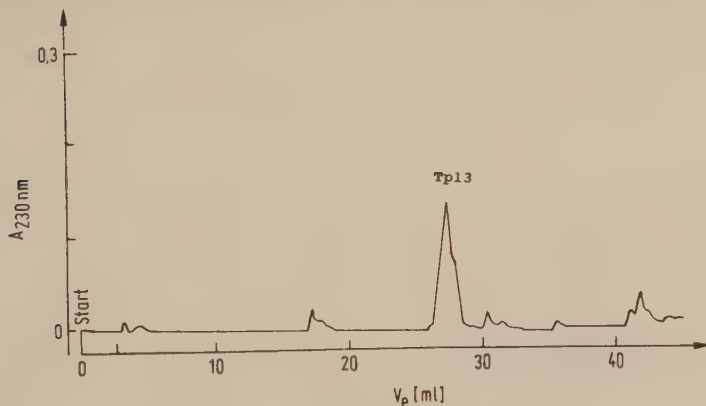


Abb.11: Isolierung von Tp 13
 Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 0-20% B in 9 Minuten
 20-40% B " 40 "
 40-60% B " 10 "

4.2.3. Auswirkung der Oxidation auf Tryptophan

Die Oxidation der Globinketten und des Inhibitors war mit einer intensiven Gelbfärbung verbunden. Bei der Hydrolyse in 5.7 N HCl wurde die Lösung von oxidierten, tryptophanhaltigen Peptiden sofort rot. In der Analyse konnte kein natives Tryptophan nachgewiesen werden.

Um die Veränderung dieser Aminosäure bei den gewählten Oxidationsbedingungen aufzuklären, wurde reines Tryptophan nach den Bedingungen in 1.1.5. oxidiert und die Reaktionsprodukte nach folgenden Verfahren untersucht.

- a) Die Messung der UV-Absorption zeigte zwei Maxima, bei 272 nm und 280 nm, natives Tryptophan nur eines bei 270 nm.
- b) Das IR-Spektrum ließ erkennen, daß keine Reinsubstanz vorlag.
- c) Das FAB-Spektrum der Abb.12 zeigt bei $M+H=205$ ein Signal für natives Tryptophan und ein weiteres bei $m/z=221$ (Massendifferenz von $m/z=16$), das durch ein zusätzliches Sauerstoffatom erklärt werden kann.

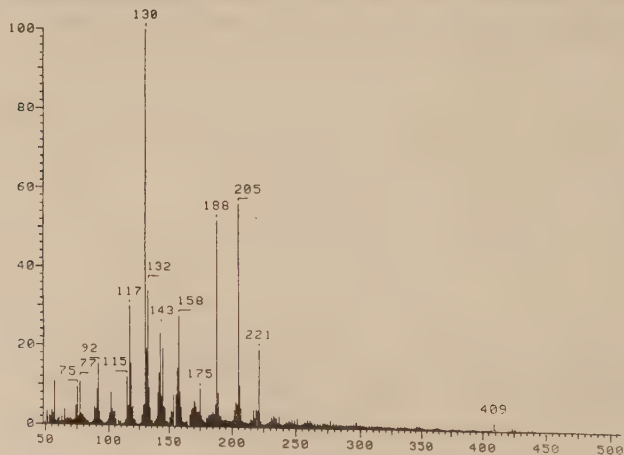


Abb.12: FAB-Spektrum des oxidierten Tryptophans. Das Signal für natives Tryptophan ($M+H$) befindet sich bei $m/z=221$, das des veränderten Tryptophans bei $m/z=205$. Der peak bei $m/z=130$ wird durch das Fragment des Skatylkations verursacht.

d) Um das veränderte Tryptophan in reiner Form zu isolieren, wurde das Oxidationsgemisch über HPLC auf RP 18 getrennt (Abb.13).

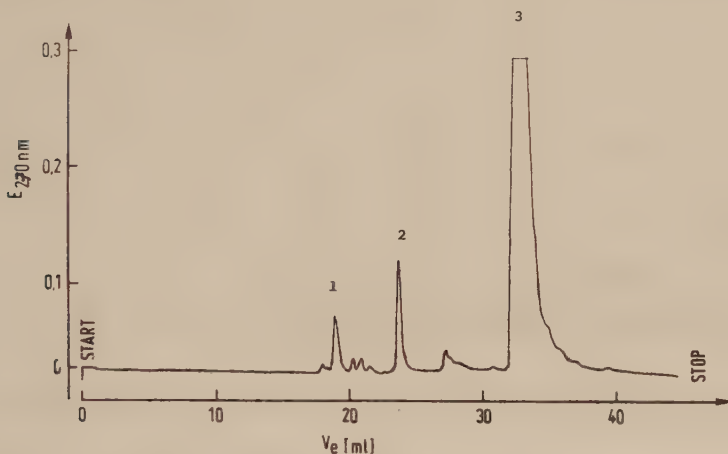


Abb.13: HPLC des oxidierten Tryptophans

Säule : RP 18 LiChrosorb

wässrige Phase : 0.1% TFA

Flußrate : 1 ml/min.

Gradient : 0-40% B in 25 Minuten
40-60% B " 5 "

Die Detektion erfolgte bei 270 nm (= Maximum der Substanzen). Zu etwa 90% liegt natives Tryptophan (Gipfel 3) vor, nachgewiesen durch Analyse und FAB-Spektrum. Die Gipfelfraktionen 1 und 2 ergaben beim FAB identische Spektren (Abb.14).

In Abb.14 erkennt man bei $m/z=221$ ein Signal für verändertes Tryptophan, dagegen keines für natives Tryptophan ($m/z=205$). Bei der Oxidation des Tryptophans wird offensichtlich die Indol-Seitenkette des Pyrrolringes hydroxyliert. Diesen Schluß läßt das Signal bei $m/z=203$ ($M+H-18$) zu, das bei nativem Tryptophan nicht zu erkennen ist, denn Hydroxyverbindungen spalten unter den Bedingungen des FAB Wasser ab.

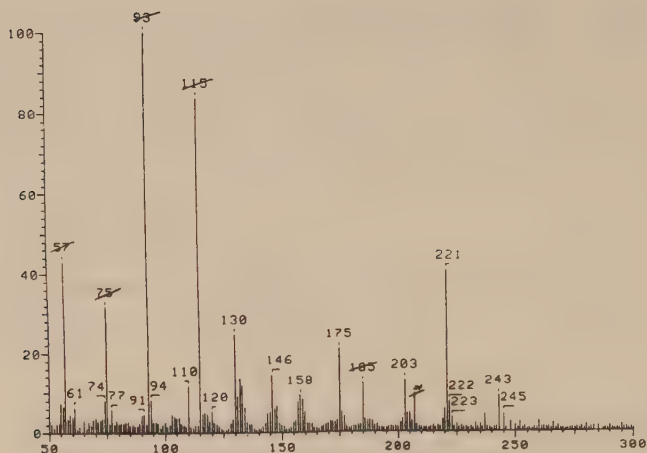


Abb.14: FAB-Spektrum von Fraktion 2 der Abb.13. Der Molekülpeak $M+H$ befindet sich bei $m/z=221$.

e) Um die Struktur des oxidierten Tryptophans aufzuklären, wurde ein H-NMR-Spektrum in Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel aufgenommen (Abb.15).

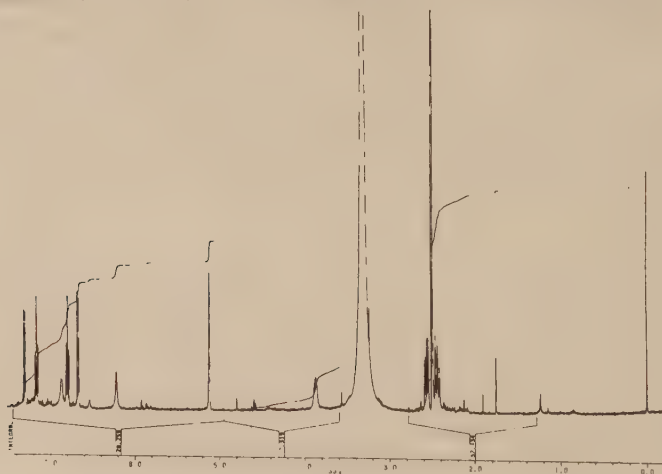
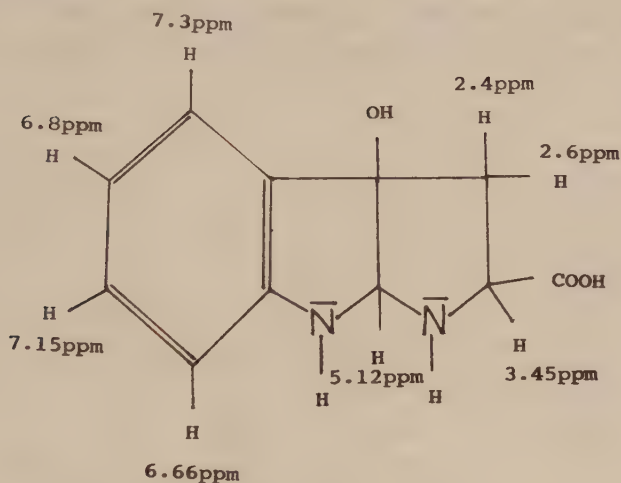


Abb.15: H-NMR des oxidierten Tryptophans (Fraktion 2 von Abb.13).

Auf Grund der Daten läßt sich folgender Vorschlag einer Strukturformel aufstellen.



Die Signale aus dem H-NMR-Spektrum werden angegeben. Die Signale bei 6.2 ppm und 6.85 ppm waren gegen D₂O austauschbar, konnten aber nicht den einzelnen aziden Protonen zugeordnet werden. Der Grund liegt in der Betainstruktur, in der die Verbindung vorliegt.

Um eine weitere Absicherung der Strukturformel zu ermöglichen, müssen die funktionellen Gruppen spezifisch derivatisiert werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter durchgeführt. Die Hydroxylierung in β -Stellung zum Indolstickstoff erlaubt Ringbildung. Diese ist aber nur möglich, wenn die α -Aminogruppe frei vorliegt. Innerhalb eines Peptidverbandes könnte sich an die α -Stellung zum Indolstickstoff Wasser anlagern und so eine zweifache Hydroxylierung verursachen. In wie weit dies eintritt muß weiter geprüft werden.

Die Einführung der zusätzlichen OH-Gruppe erhöht die Anfälligkeit des Moleküls gegenüber Oxidationen. Interessant ist der Befund, daß aus nativem Tryptophan ein definiertes Umwandlungsprodukt entsteht.

4.2.4. Tryptische Spaltung der β -Ketten

Oxidiertes Material wurde wie in 1.2.1. beschrieben tryptisch gespalten und direkt über HPLC getrennt (Abb.16). Die Bindungen zwischen Tp 10b und Tp 11 wurden nur zu ca. 50% gespalten.

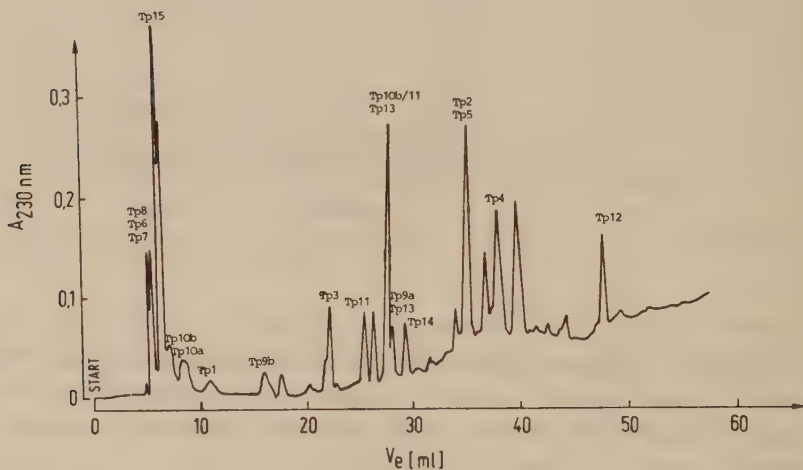


Abb.16: HPLC der tryptischen Peptide

Säule : RP 2 LiChrosorb

wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac

Flußrate : 1.5 ml/min.

Gradient : 0-40% B in 40 Minuten

40-60% B " 10 "

Kleine Peptide (Tp 6,7,8,15) konnten nicht getrennt werden. Deren Rechromatographie zeigt Abb.17.

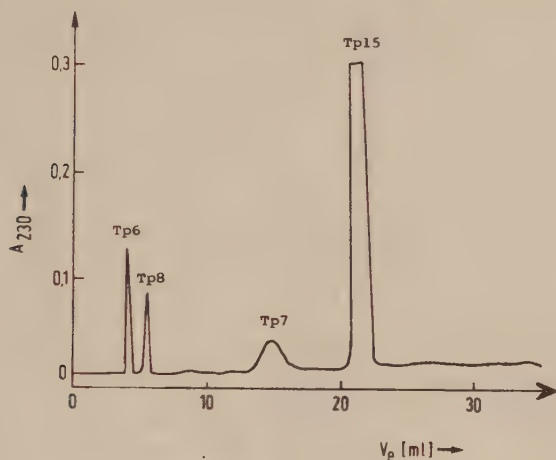


Abb.17: HPLC von Tp 6, 7, 8, 15
 Säule : RP 18 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 10 Minuten isokratisch
 0-60% B in 30 Minuten

Ein besonderer Fall lag bei den Peptiden Tp 10b/11, 13 und 9a vor. Alle drei wurden mit gleicher Retentionszeit von der Säule eluiert und ergaben bei der Elektrophorese nur einen Ninhydrin-positiven Fleck. Auf Grund der Analyse wurde geschlossen, daß mehrere Peptide vorlagen. Sie wurden auf Vydac RP 18 getrennt. Unter verschiedenen Gradienten-Programmen hat sich das in der Legende zu Abb.18 dargestellte als am besten geeignet erwiesen. Ein entsprechendes Problem stellte sich bei Tp 5 und Tp 2. Es wurde ebenfalls auf Vydac RP 18 gelöst. Im Unterschied zum eben dargestellten Fall wurde ein noch flacherer Gradient gewählt (Abb.19).

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tabelle 1 gegeben.

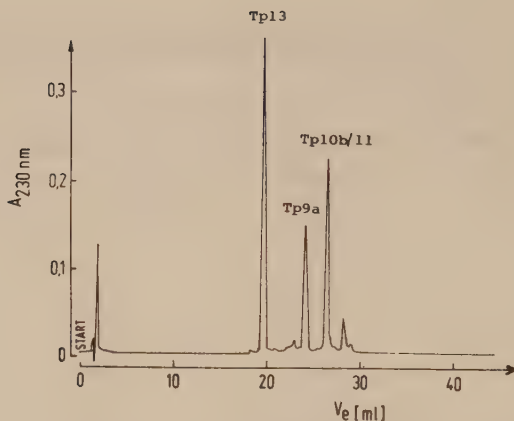


Abb.18: HPLC von Tp 10b/11, 13, 9a
 Säule : Vydac RP 18 weitpor
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : Start mit 10% B
 10-35% B in 40 Minuten
 35-60% B " 5 "

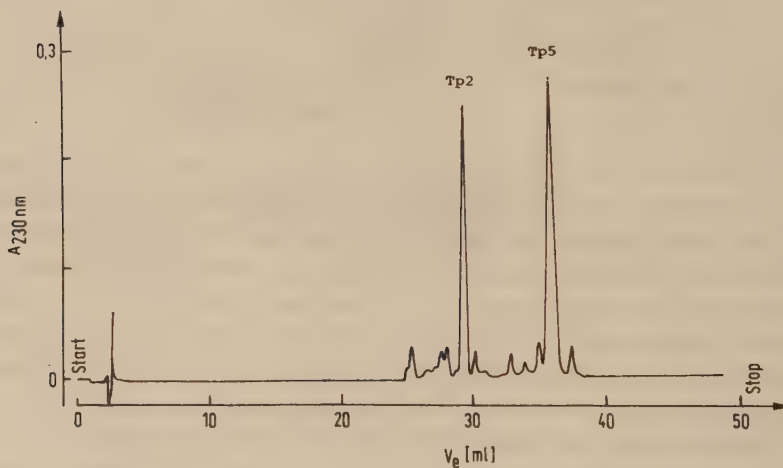


Abb.19: HPLC von Tp 5, 2
 Säule : Vydac RP 18 weitpor
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : Start mit 10% B
 10-35% B in 45 Minuten
 35-60% B " 5 "

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	--	--	1.81	--	5.21	--	--	--	2.07
Thr	1.31(1)	0.93	--	1.18	--	--	--	--	--
Ser	--	1.04	--	--	3.02	--	--	--	1.72
Glx	2.44(2)	--	2.13	1.12	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	1.19	1.07	--	--	--	--
Gly	1.27	2.06	3.15	--	1.04	--	0.99	--	1.03
Ala	--	--	1.19	--	2.14	--	0.95	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.86	1.10	2.77	1.34(2)	--	1.10	--	--	0.97
Met	--	--	--	--	0.71	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	0.74	--	--	--	--
Leu	1.20	2.24	1.02	2.22	1.24	--	--	--	2.16
Tyr	--	--	--	1.02	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	3.18	--	--	--	0.96
His	0.91	--	--	--	--	--	0.81	--	--
Trp	--	0.67	--	0.88	--	--	--	--	--
Lys	1.22	0.95	--	--	1.04	0.90	1.25	1.00	1.09
Arg	--	--	0.93	1.06	--	--	--	--	--
Total	8	9	13	10	19	2	4	1	10

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10b 88-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	3.16	--	1.07	2.00	1.04	--	1.20	--	17.02(17)
Thr	--	1.05	--	--	--	0.99	--	--	5.35(5)
Ser	--	--	1.04	--	--	--	--	--	7.11(7)
Glx	--	--	0.98	0.98	--	3.95	--	--	10.72(11)
Pro	--	--	--	0.95	--	0.82	--	--	3.86(4)
Gly	--	0.99	--	--	2.00	--	1.31	--	12.99(13)
Ala	--	1.04	--	--	1.13	1.99	3.87	--	12.37(12)
Cys	--	--	0.89	--	0.98	--	--	--	1.94(2)
Val	--	--	--	1.02	2.87	1.13	2.01(3)	--	16.59(17)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	1.05(1)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	1.17(1)
Leu	1.83	--	1.92	1.23	4.05	--	1.37	--	18.84(19)
Tyr	--	--	--	--	--	0.99	--	1.04	3.07(3)
Phe	--	0.90	--	0.95	1.02	1.12	--	--	8.09(8)
His	--	--	1.00	0.89	1.94	--	0.99	0.96	8.09(8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--	1.59(2)
Lys	1.02	1.02	1.10	1.03	0.97	1.01	1.14	--	13.84(14)
Arg	--	--	--	--	--	--	--	--	2.16(2)
Total	6	5	8	9	16	12	12	2	146

Tab.1: Analysen der tryptischen Peptide der β -Ketten des Hb des Kragenbären (*Ursus tibetanus*). In Klammern sind die Werte aus der Sequenzanalyse angegeben.

4.2.5. Chemische Spaltung der α -Ketten

Die Durchführung der Spaltung erfolgte wie in 1.2.2. beschrieben unter denaturierenden Bedingungen und Ausnutzung der Säurelabilität der Asp-Pro-Bindung. Die chromatographische Trennung zeigt Abb.20.

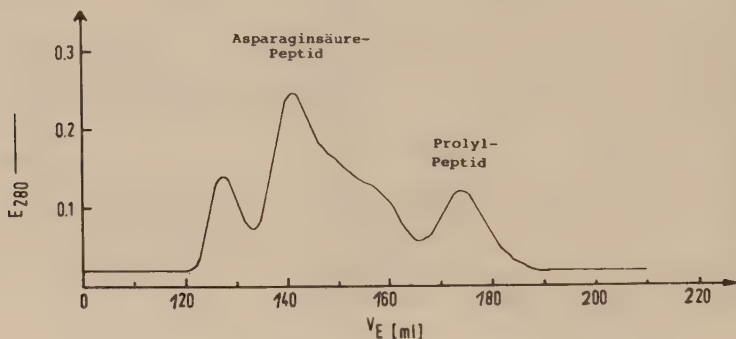


Abb.20: Trennung auf Sephadex G50 fine
 Säulenlänge : 163 cm (Durchmesser 2.5 cm)
 Elutionsmittel : 10% Ameisensäure/8M Harnstoff
 Flußrate : 20 ml/min.

Die Entsalzung konnte nicht, wie sonst üblich, auf Sephadex G25 mit 1 N Essigsäure als Elutionsmittel erfolgen, da das Prolyl-Peptid hierin wenig löslich war. Auf einer Biogel P2 Säule mit 10% Ameisensäure (Bedingungen siehe 1.2.3.1.) war die Entfernung des Guanidins quantitativ möglich.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tabelle 2 gegeben.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.14	0.99	0.99	—	—	0.97	—	—
Thr	—	—	1.06	—	2.88	1.05	—	—
Ser	1.06	0.87	—	0.92	1.02	2.18	—	—
Glx	—	—	—	3.08	—	1.08	—	—
Pro	0.91	—	—	—	1.11	1.54(2)	—	—
Gly	—	—	—	4.15	—	1.12	1.01	—
Ala	1.09	—	1.00	2.00	0.96	1.04	0.97	—
Cys	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	0.86	0.98	—	—	—	0.92	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	0.91	—	—	—	—
Leu	1.15	—	—	1.02	—	0.99	—	—
Tyr	—	—	—	0.93	—	0.93	—	—
Phe	—	—	—	—	2.05	2.19	—	—
His	—	—	—	1.01	—	1.11	0.97	—
Trp	—	—	0.76	—	—	—	—	—
Lys	1.20	1.15	1.18	—	0.98	0.90	1.06	1.00
Arg	—	—	—	0.97	—	—	—	—
Total	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9 62-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse	Pro- Peptid
Asx	4.42(4)	—	1.67(2)	1.10	—	—	11.58(11)	2.47(2)
Thr	1.94	—	—	2.00	1.93	—	10.46(11)	3.84(4)
Ser	1.91	—	—	3.14	3.11	—	13.54(14)	5.72(6)
Glx	—	—	—	1.00	—	—	5.15(5)	1.44(1)
Pro	0.97	—	1.49(1)	1.90	—	—	7.62(8)	2.79(3)
Gly	1.95	—	—	—	—	—	8.46(8)	—
Ala	6.76(7)	—	—	4.02	1.06	—	18.97(19)	4.83(5)
Cys	—	—	—	0.98	—	—	0.99(1)	0.95(1)
Val	0.88	—	2.02	1.68(2)	1.92	—	9.75(10)	4.45(5)
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	—	—	—	0.97(1)	—
Leu	6.24	0.86	—	5.36	1.14	—	16.45(16)	6.01(6)
Tyr	—	—	—	—	—	0.89	3.33(3)	1.19(1)
Phe	—	—	0.83	2.08	1.86	—	9.08(9)	4.49(5)
His	3.02	—	—	3.86	—	—	9.78(10)	3.73(4)
Trp	—	—	—	—	—	—	0.89(1)	—
Lys	1.03	—	0.91	0.96	0.98	—	10.96(11)	3.24(3)
Arg	—	1.14	—	—	—	1.11	2.92(3)	0.96(1)
Total	29	2	7	28	12	2	141	47

Tab.2: Analysen der tryptischen Peptide, des Prolyl-Peptids und der α -Ketten des Hb des Kragenbären (*Ursus tibetanus*). In Klammern sind die Werte aus der Sequenzanalyse angegeben.

4.3. Ailuropoda melanoleuca (Panda)

Die α - und β -Ketten wurden oxidiert, um eine stärkere Denaturierung zu erreichen und damit die Bindungen zwischen Tp 12 und Tp 13 der α -Ketten dem Enzym zugänglicher zu machen; außerdem waren Tp 12 der α -Ketten (Oxidation der Cysteine) und Tp 5 der β -Ketten (Oxidation der Methionine) besser löslich. Die Spaltzeit ließ sich auf drei Std. begrenzen. Der Verlauf der Reaktion wurde mit analytischen HPLC-Läufen (2 nmol Substanz) überwacht.

4.3.1. Tryptische Spaltung der α -Ketten

Bei der Trennung der Peptide über HPLC (RP 2) wurde die Flußrate auf 1 ml/min. gesenkt (Abb.21).

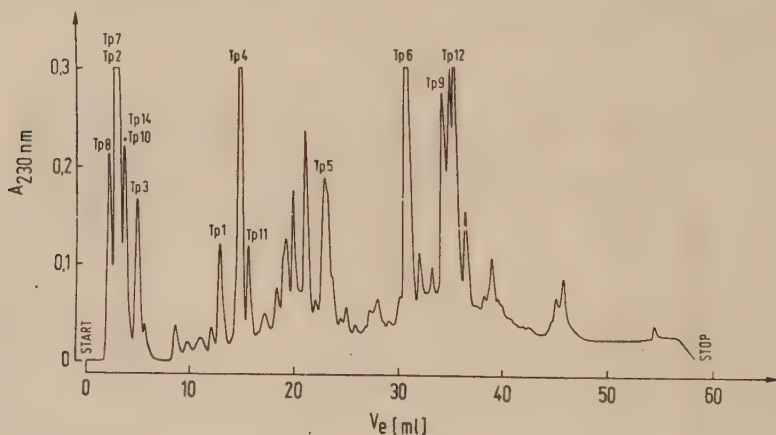


Abb.21: HPLC der tryptischen Peptide
 Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH₄Ac
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 0-40% B in 40 Minuten
 40-60% B " 10 "

Tp 9 konnte nur unbefriedigend von Tp 12 getrennt werden und mußte auf RP 2 mit 0.1% TFA als wässrige Phase rechromatographiert werden. Die Trennung wurde mit 10% B begonnen und auf 50% B in 50 Minuten gesteigert.

Tp 2, 7, 10 und 14 mußten auf RP 18 (Bedingungen siehe Abb.17) gereinigt werden (keine Abbildungen).

Um die zeitaufwendige Trennung der Peptide auf Sephadex zu vermeiden, wurden die tryptischen Peptide wie in 1.2.3.2. beschrieben auf TSK-Gel mit verschiedenen Durchflußraten (0.5, 0.7, 0.8 ml/min.) isokratisch getrennt. Das Trennbild wurde aber davon in keiner Weise beeinflusst, dagegen variierte die Dauer eines HPLC-Laufes deutlich: bei einem Durchfluß von 0.8 ml/min. war die Trennung nach 30 Minuten, bei 1 ml/min. bereits nach 20 Minuten beendet (vgl. bei Sephadex 30 Std.). Die Messung der Extinktion erfolgte bei 230 nm und 280 nm (Abb.22).

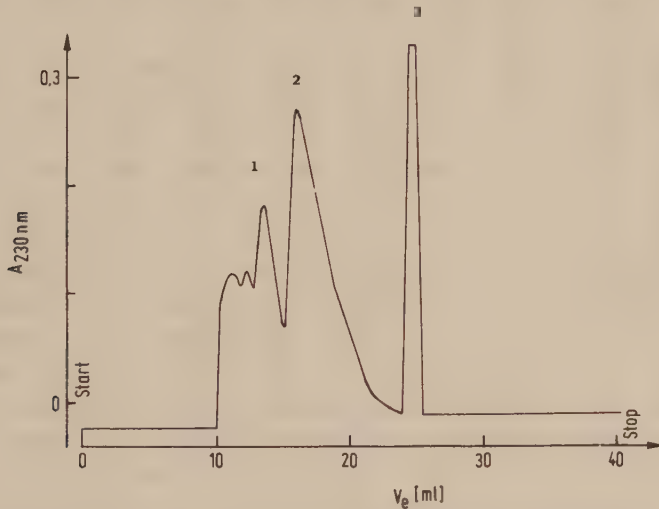


Abb.22: HPLC der tryptischen Peptide auf TSK-Gel

Eine verbesserte Trennleistung wäre mit einem NaCl-Gradienten möglich gewesen. Dies konnte mangels geeigneter Pumpen (Keramik- oder besser Titanpumpen) nicht durchgeführt werden.

Die Elektrophorese zeigte, daß sich fast alle Peptide in der Gipffraktion 1 und 2 befanden, ohne daß man eine nennenswerte Sortierung nach Größe erkennen konnte. Nur Dipeptide (Tp 6, 10 und 14) waren in Gipffraktion 3 getrennt. Die Prüfung auf HPLC (Bedingungen siehe Abb.21) ergab für die Fraktionen 1 und 2 ein ähnlich komplexes Bild wie für den gesamten tryptischen Ansatz. Die Methode wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tabelle 3 gegeben.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	0.96	1.09	1.10	--	--	1.00	--	--
Thr	--	1.02	1.05	--	2.93	0.89	--	--
Ser	0.82	--	--	--	0.97	1.97	--	--
Glx	--	--	--	3.06	--	1.00	--	--
Pro	0.99	--	--	--	1.02	1.96	--	--
Gly	--	--	--	5.21	--	0.97	0.93	--
Ala	0.93	--	1.15	2.25	0.97	1.08	0.97	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	1.02	0.92	--	--	--	0.90	--	--
Met	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	0.71	--	--	--	--
Leu	1.25	--	--	1.12	--	1.10	--	--
Tyr	--	--	--	0.79	--	0.89	--	--
Phe	--	--	--	--	2.06	2.09	--	--
His	--	--	--	0.97	--	1.33	1.00	--
Trp	--	--	0.66	--	--	--	--	--
Lys	1.00	1.00	1.04	--	1.05	0.81	1.10	1.00
Arg	--	--	--	0.88	--	--	--	--
Total	7	4	5	15	9	16	4	1

Tab.3: Analysen der tryptischen Peptide der α -Ketten des Hb de Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). In Klammern sind die Werte auf der Sequenzanalyse angegeben.

	Tp9 Pos. 62-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	3.89	--	2.09	1.54(1)	--	--	11.15(11)
Thr	2.11	--	--	2.12	1.87	--	11.69(12)
Ser	2.14	--	--	2.79	2.68(3)	--	11.71(12)
Glx	--	--	--	0.84	--	--	5.28(5)
Pro	1.18	--	1.04	2.00	--	--	7.40(8)
Gly	2.07	--	--	--	--	--	9.79(9)
Ala	5.80	--	--	3.88	1.13	--	17.53(18)
Cys	--	--	--	1.03	--	--	1.30(1)
Val	1.97	--	2.02	1.89	1.80	--	10.91(11)
Met	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	0.96(1)
Leu	6.32	1.04	--	6.46(6)	1.38	--	17.05(17)
Tyr	--	--	--	--	--	0.96	2.72(3)
Phe	--	--	0.92	1.45(1)	1.83	--	8.26(8)
His	3.00	--	--	3.71(4)	--	--	10.28(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	0.98(1)
Lys	0.76	--	0.94	0.94	1.10	--	10.95(11)
Arg	--	0.96	--	--	--	1.04	2.65(3)
Total	29	2	7	28	12	2	141

Tab.3: Fortsetzung

4.3.2. Tryptische Spaltung der B-Ketten

Das oxidierte Kettenmaterial wurde 3 Std. tryptisch gespalten und auf Sephadex getrennt (siehe 1.2.3.1.). Der Durchfluß wurde auf 16 ml/min. vermindert (vgl. 20 ml/min. in Abb.4), um eine bessere Trennung zu erreichen (Abb.23).

In der letzten Gipfelfraktion wurde Tp 15, in den übrigen Fraktionen wurden jeweils mindestens zwei Peptide nachgewiesen. Sie wurden nach den in den Abb. 5-10 beschriebenen Bedingungen auf HPLC getrennt. Die Flußrate wurde auf 1 ml/min. gesenkt (keine Abbildungen).

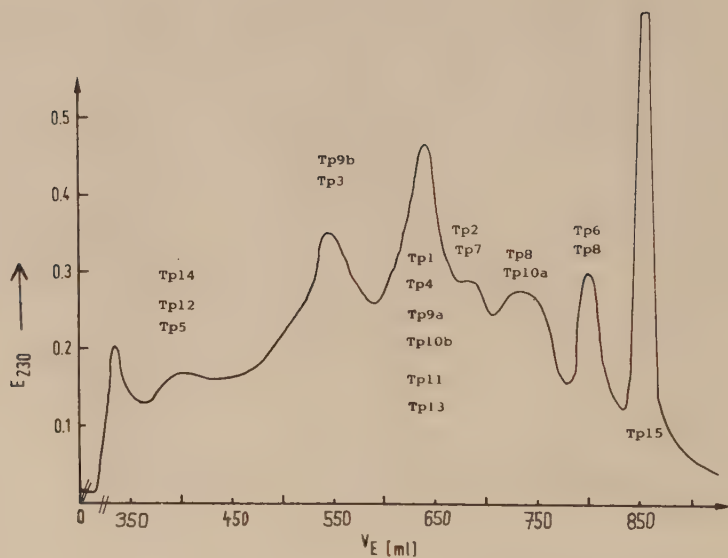


Abb.23: tryptische Peptide auf Sephadex G25 fine
 Säulenlänge : 142 cm (Durchmesser 2.5 cm)
 Elutionsmittel : 0.1 N Essigsäure
 Flußrate : 16 ml/min.

Die Ergebnisse der Analysen werden in Tabelle 4 gegeben.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	--	--	2.02	--	5.45(5)	--	--	--	1.09
Thr	0.95	0.84	--	1.05	0.88	--	--	--	--
Ser	--	0.93	--	--	1.97	--	--	--	2.01
Glx	2.24	--	2.13	1.05	--	--	--	--	1.08
Pro	--	--	--	1.15	2.05	--	--	--	--
Gly	1.10	1.16	3.03	--	1.12	--	0.93	--	1.03
Ala	--	1.83	0.95	--	0.96	--	0.97	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.58(1)	1.03	2.96	1.69(2)	0.88	0.97	--	--	0.78
Met	--	--	--	--	0.75	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.25	1.36(1)	0.98	2.19	1.44(1)	--	--	--	1.95
Tyr	--	--	--	0.84	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.80	--	--	--	1.01
His	0.73	--	--	--	--	--	1.02	--	--
Trp	--	0.75	--	0.78	--	--	--	--	--
Lys	1.16	0.91	--	--	1.13	1.03	1.08	1.00	1.06
Arg	--	--	0.97	1.05	--	--	--	--	--
Total	8	9	13	10	19	2	4	1	10

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10b 88-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	3.11	--	1.01	2.13	1.04	--	1.35	--	16.80(16)
Thr	--	1.04	--	--	--	0.77	--	--	6.22(6)
Ser	--	--	0.89	--	--	--	--	--	6.21(6)
Glx	--	--	0.95	1.04	--	4.51(4)	--	--	11.83(12)
Pro	--	--	--	1.08	--	0.95	--	--	4.57(5)
Gly	--	0.98	--	--	2.17	--	1.12	--	12.78(12)
Ala	--	0.99	--	--	1.02	1.88	4.07	--	13.78(13)
Cys	--	--	0.95	--	0.88	--	--	--	2.20(2)
Val	--	--	--	0.91	2.81	0.89	2.34(3)	--	17.57(18)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	1.09(1)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.90	--	2.12	0.99	4.03	--	1.30	--	18.77(18)
Tyr	--	--	--	--	--	0.84	--	0.89	2.93(3)
Phe	--	0.98	--	0.91	1.00	1.08	--	--	7.81(8)
His	--	--	1.07	0.94	2.03	--	1.20	1.11	8.39(8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--	1.96(2)
Lys	0.99	1.02	1.01	1.00	1.01	0.95	1.14	--	13.91(14)
Arg	--	--	--	--	--	--	--	--	2.02(2)
Total	6	5	8	9	16	12	12	2	146

Tab.4: Analysen der tryptischen Peptide der β -Ketten des Hb des Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). In Klammern sind die Werte aus der Sequenzanalyse angegeben.

4.4. Ailurus fulgens (Kleiner Panda)

Tryptische Spaltung der α - und β -Ketten

Die Spaltung mit Trypsin wurde wie in 4.3. beschrieben durchgeführt. Die Chromatographie der Peptide erfolgte wie in 4.3.2. beschrieben (keine Abbildungen); die Trennbilder entsprechen weitgehend denen in Abb.4 (α -Ketten) und Abb.23 (β -Ketten).

Die Peptide der einzelnen Gipfelfraktionen mußten wie in 4.2.1. (α -Ketten) bzw. in 4.3.2. (β -Ketten) beschrieben rechromatographiert werden. Die Abbildungen der einzelnen HPLC-Läufe werden nicht aufgeführt.

Die Ergebnisse der Analysen werden in den Tabellen 5 und 6 gegeben.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	0.98	1.09	1.06	--	--	0.98	--	--
Thr	--	1.02	0.96	--	2.85	0.95	--	--
Ser	0.90	--	0.95	--	1.05	1.95	--	--
Glx	--	--	--	3.06	--	1.01	--	--
Pro	1.14	--	--	--	1.05	2.06	--	--
Gly	--	--	--	4.95	--	1.01	0.99	--
Ala	1.01	--	--	2.18	0.99	1.01	1.00	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.89	0.92	--	--	--	0.91	--	--
Met	--	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.05	--	--	1.98	--	1.07	--	--
Tyr	--	--	--	0.96	--	0.97	--	--
Phe	--	--	--	--	2.08	2.04	--	--
His	--	--	--	0.95	--	1.09	1.00	--
Trp	--	--	0.87	--	--	--	--	--
Lys	1.03	1.03	0.99	--	0.98	0.93	1.00	1.00
Arg	--	--	--	0.92	--	--	--	--
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Tab.5: Analysen der tryptischen Peptide der α -Ketten des Hb des Kleinen Panda (*Ailurus fulgens*). In Klammern sind die Werte der Sequenzanalyse angegeben.

Pos.	Tp9 62-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	4.02	--	2.01	1.00	--	--	11.55(11)
Thr	0.98	--	--	1.99	1.89	--	10.65(11)
Ser	1.91	--	--	1.98	2.96	--	11.60(12)
Glx	--	--	--	1.01	--	--	5.56(5)
Pro	1.11	--	1.01	2.08	--	--	7.93(8)
Gly	1.93	--	--	--	--	--	9.45(9)
Ala	6.17	--	--	4.20	1.01	--	16.52(17)
Cys	--	--	--	1.77(2)	--	--	2.02(2)
Val	2.04	--	2.00	1.78(2)	2.00	--	11.17(11)
Met	--	--	--	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	--
Leu	7.17	1.08	--	6.19	1.22	--	19.71(19)
Tyr	--	--	--	--	--	0.97	3.21(3)
Phe	--	--	1.02	1.02	1.95	--	7.85(8)
His	2.84	--	--	4.16	--	--	10.06(10)
Trp	--	--	--	--	--	--	1.04(1)
Lys	0.99	--	0.96	1.00	0.97	--	11.02(11)
Arg	--	0.92	--	--	--	1.03	2.83(3)
Summe	29	2	7	28	12	2	141

Tab.5: Fortsetzung

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	--	--	1.99	--	4.12	--	--	--	0.92
Thr	0.97	0.81	--	1.14	--	--	--	--	--
Ser	--	0.82	--	--	2.82	--	--	--	1.69(2)
Glx	2.00	--	2.04	1.10	--	--	--	--	0.93
Pro	--	--	--	1.14	2.13	--	--	--	--
Gly	1.05	1.03	2.94	--	2.05	--	0.96	--	0.97
Ala	--	1.92	1.01	--	1.07	--	0.94	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.75	0.97	2.90	1.79	0.85	0.99	--	--	0.82
Met	--	--	--	--	0.75	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	1.27	1.30	1.17	2.03	1.20	--	--	--	1.86
Tyr	--	--	--	1.05	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.95	--	--	--	0.94
His	0.83	--	--	--	--	--	0.98	--	--
Trp	--	0.94	--	0.89	--	--	--	--	--
Lys	1.13	0.93	--	--	1.08	1.01	1.12	1.00	0.97
Arg	--	--	0.95	1.02	--	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10

b.6: Analysen der tryptischen Peptide der B-Ketten des Hb des
 einen Panda (Ailurus fulgens). In Klammern sind die Werte aus
 r Sequenzanalyse angegeben.

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10b 88-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	2.89	--	1.00	1.88	1.05	--	1.02	--	15.50(15)
Thr	--	1.00	--	--	--	0.95	--	--	5.33(5)
Ser	--	--	0.88	--	--	--	--	--	6.97(7)
Glx	--	--	0.92	0.96	--	3.97	--	--	11.89(12)
Pro	--	--	--	1.15	--	1.09	--	--	5.29(5)
Gly	--	0.99	--	--	2.06	--	1.13	--	13.46(13)
Ala	--	0.99	--	--	1.04	1.83	3.58(4)	--	13.41(13)
Cys	--	--	1.04	--	1.04	--	--	--	1.94(2)
Val	--	--	--	1.05	2.81	1.02	2.28(3)	--	17.24(18)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	0.69(1)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Leu	2.08	--	2.13	1.13	3.95	--	1.32	--	18.83(18)
Tyr	--	--	--	--	--	0.97	--	0.94	3.19(3)
Phe	--	1.01	--	0.99	1.07	1.06	--	--	8.15(8)
His	--	--	1.05	0.93	1.94	--	1.01	1.06	8.60(8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--	1.98(2)
Lys	1.03	1.00	0.97	1.04	1.04	1.12	1.01	--	13.84(14)
Arg	--	--	--	--	--	--	--	--	1.96(2)
Summe	6	5	8	9	16	12	12	2	146

Tab.6: Fortsetzung

Die Isolierung der tryptischen Peptide der Globine von Kragenbär, Panda und Kleinem Panda zeigte, daß die Gelchromatographie die saubersten Peptide lieferte. Dabei müssen ca. 25% Ausbeuteverluste und ein großer Zeitaufwand in Kauf genommen werden. Die direkte HPLC-Trennung war bereits nach einer Stunde beendet, lieferte aber bei kleinen (bis vier Aminosäuren) und einigen längeren Peptiden (siehe 4.2.4. und 4.3.1.) nur unbefriedigende Ergebnisse. Die HPLC-Bedingungen wurden modifiziert; dadurch mußten nur mehr kleine Peptide (Tp 2, 7, 10 und 14 bei den α -Ketten und Tp 6, 7 und 15 bei den β -Ketten) rechromatographiert werden (Bedingungen siehe Abb.17).

4.5. *Helarctos malayanus* (Malaienbär)

Tryptische Spaltung der α - und β -Ketten

Je 6 mg oxidierte α - bzw. β -Ketten wurden tryptisch gespalten (siehe 4.3.). Bei jedem HPLC-Lauf wurden nur mehr 20 nmol getrennt (bisher wurden pro Lauf 40 nmol eingesetzt). Um geringere Substanzmengen nachweisen zu können, wurde bei 220 nm detektiert. Wegen zu starker Absorption des NH_4Ac wurde als wässrige Phase 0.1% TFA verwendet, das eine höhere UV-Durchlässigkeit besitzt. Die Empfindlichkeit konnte dadurch um den Faktor 5 gesteigert werden (Abb.24 und 25).

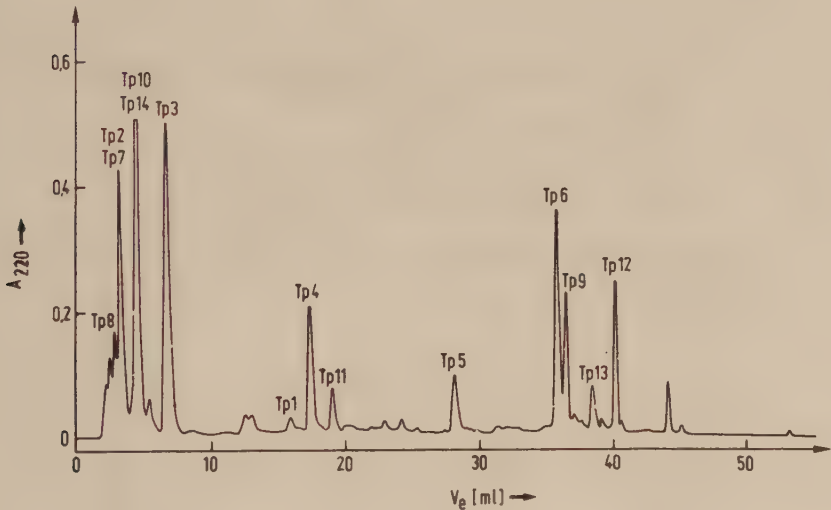


Abb.24: HPLC der tryptischen Peptide der α -Ketten

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 0-40% B in 45 Minuten
 40-60% B " 10 "

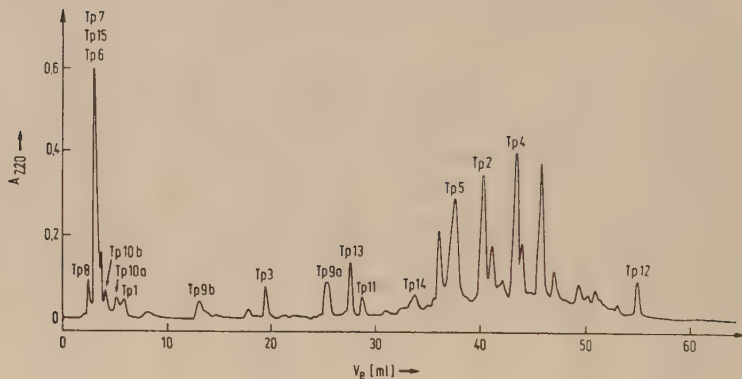


Abb.25: HPLC der tryptischen Peptide der β -Ketten
 Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 2 Minuten isokratisch
 0-50% B in 60 Minuten
 50-60% B " 2 "

Die Ergebnisse der Analysen werden in den Tabellen 7 und gegeben.

Pos.	Tp1 1-7	Tp2 8-11	Tp3 12-16	Tp4 17-31	Tp5 32-40	Tp6 41-56	Tp7 57-60	Tp8 61
Asx	1.24	1.19	1.20	—	—	1.18	—	—
Thr	—	—	1.00	—	2.98	0.98	—	—
Ser	0.91	0.89	—	0.94	1.00	1.90	—	—
Glx	—	—	—	3.18	—	0.98	—	—
Pro	1.11	—	—	—	1.15	1.14	—	—
Gly	—	—	—	4.11	—	1.11	1.01	—
Ala	1.06	—	1.10	2.10	1.10	1.24	0.99	—
Cys	—	—	—	—	—	—	—	—
Val	0.96	0.98	—	—	—	0.90	—	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	0.82	—	—	—	—
Leu	1.21	—	—	1.12	—	1.30	—	—
Tyr	—	—	—	0.91	—	0.83	—	—
Phe	—	—	—	—	1.92	1.83	—	—
His	—	—	—	0.95	—	1.01	0.98	—
Trp	—	—	0.86	—	—	—	—	—
Lys	1.10	1.01	1.08	—	0.96	0.94	1.02	1.00
Arg	—	—	—	0.99	—	—	—	—
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1

Pos.	Tp9 62-90	Tp10 91-92	Tp11 93-99	Tp12 100-127	Tp13 128-139	Tp14 140-141	Ketten- analyse
Asx	4.12	—	2.01	1.15	—	—	11.48(11)
Thr	1.91	—	—	2.11	1.88	—	10.69(11)
Ser	1.81	—	—	3.09	2.79	—	13.52(14)
Glx	—	—	—	1.15	—	—	5.20(5)
Pro	1.10	—	0.96	2.09	—	—	7.09(7)
Gly	2.09	—	—	—	—	—	8.46(8)
Ala	6.96	—	—	4.22	1.16	—	19.09(19)
Cys	—	—	—	0.82	—	—	0.91(1)
Val	0.98	—	1.97	2.00	1.95	—	9.65(10)
Met	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	—	—	—	0.91(1)
Leu	6.14	1.09	—	5.28	1.13	—	17.60(17)
Tyr	—	—	—	—	—	1.10	3.01(3)
Phe	—	—	0.97	2.18	1.91	—	9.11(9)
His	3.08	—	—	3.84	—	—	9.89(10)
Trp	—	—	—	—	—	—	0.99(1)
Lys	1.00	—	1.03	1.07	1.00	—	11.01(11)
Arg	—	0.91	—	—	—	0.90	2.85(3)
Summe	29	2	7	28	12	2	141

Tab.7: Analysen der tryptischen Peptide der α -Ketten des Hb des Malaienbären (*Helarctos malayanus*). In Klammern sind die Werte aus der Sequenzanalyse angegeben.

Pos.	Tp1 1-8	Tp2 9-17	Tp3 18-30	Tp4 31-40	Tp5 41-59	Tp6 60-61	Tp7 62-65	Tp8 66	Tp9a 67-76
Asx	--	--	2.12	--	4.95	--	--	--	1.95
Thr	0.91	0.93	--	0.96	--	--	--	--	--
Ser	--	0.94	--	--	2.82	--	--	--	1.75
Glx	2.12	--	2.13	1.12	--	--	--	--	--
Pro	--	--	--	1.11	1.07	--	--	--	--
Gly	1.17	2.06	3.11	--	1.14	--	0.99	--	1.12
Ala	--	--	1.09	--	2.15	--	0.95	--	--
Cys	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Val	0.98	1.00	2.84	1.88	--	1.04	--	--	1.04
Met	--	--	--	--	0.85	--	--	--	--
Ile	--	--	--	--	0.85	--	--	--	--
Leu	1.20	2.24	1.12	2.22	1.22	--	--	--	2.15
Tyr	--	--	--	1.02	--	--	--	--	--
Phe	--	--	--	--	2.97	--	--	--	1.00
His	0.90	--	--	--	--	--	0.81	--	--
Trp	--	0.87	--	0.98	--	--	--	--	--
Lys	1.02	1.05	--	--	1.10	0.96	1.25	1.00	0.99
Arg	--	--	0.87	0.93	--	--	--	--	--
Summe	8	9	13	10	19	2	4	1	10

Pos.	Tp9b 77-82	Tp10a 83-87	Tp10b 88-95	Tp11 96-104	Tp12 105-120	Tp13 121-132	Tp14 133-144	Tp15 145-146	Ketten- analyse
Asx	3.13	--	1.09	2.00	1.04	--	1.23	--	17.22(17)
Thr	--	1.04	--	--	--	0.99	--	--	5.01(5)
Ser	--	--	0.88	--	--	--	--	--	6.89(7)
Glx	--	--	1.10	1.30	--	4.09	--	--	11.13(11)
Pro	--	--	--	0.93	--	0.95	--	--	3.99(4)
Gly	--	1.01	--	--	2.04	--	1.30	--	13.12(13)
Ala	--	1.04	--	--	1.00	1.99	3.97	--	12.17(12)
Cys	--	--	0.89	--	0.98	--	--	--	1.89(2)
Val	--	--	--	1.09	2.94	1.13	2.38(3)	--	16.56(17)
Met	--	--	--	--	--	--	--	--	0.87(1)
Ile	--	--	--	--	--	--	--	--	0.89(1)
Leu	1.86	--	1.98	1.05	4.03	--	1.27	--	19.23(19)
Tyr	--	--	--	--	--	0.89	--	1.01	3.01(3)
Phe	--	0.91	--	1.00	0.97	1.03	--	--	8.01(8)
His	--	--	1.01	0.90	2.03	--	0.93	0.99	8.02(8)
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--	1.99(2)
Lys	1.00	1.02	1.11	1.03	1.00	1.01	1.11	--	13.94(14)
Arg	--	--	--	--	--	--	--	--	1.97(2)
Summe	6	5	8	9	16	12	12	2	146

Tab.8: Analysen der tryptischen Peptide der β -Ketten des Hb des Malaienbären (*Helarctos malayanus*). In Klammern sind die Werte aus der Sequenzanalyse angegeben.

Die Ausbeute an tryptischen Peptiden betrug nach der HPLC-Trennung für die α -Ketten 75%; Tp 3, 12 und 13 fielen nur zu 40% an. Bei den β -Ketten wurde die Hälfte der Peptide ebenfalls zu 75% erhalten; Tp 1, 2, 4, 10a, 12, 13 und 14 wurden zu 40% wiedergefunden.

Interessant ist, daß die α - und β -Ketten der Hb von Malaien- und Kragenbär identisch sind. Aus den Triton- und Disk-Elektrophoresen war dies nicht abzusehen, da beide Methoden zu unempfindlich und nicht exakt reproduzierbar sind. So lieferten die Globine der vier Bären annähernd das gleiche Bild (siehe Abb.1). Aus demselben Grund konnte dies auch nicht aus den Abbildungen der Kettentrennungen geschlossen werden.

Alle nativen Ketten (jeweils 2 mg) wurden 42 Schritte, das Prolyl-Peptid (2 mg) 34 Schritte sequenziert. Die Zuordnung der Peptide erfolgte auf Grund der Homologie zu den α - und β -Ketten von Human-Hämoglobin⁽³⁶⁾.

Die Abbildungen 26 a-c zeigen die Sequenzen der α - und β -Ketten der Hb von Panda, Kleinem Panda und Kragenbär (bzw. Malaienbär) im Vergleich zu denen von Human-Hb⁽³⁶⁾.

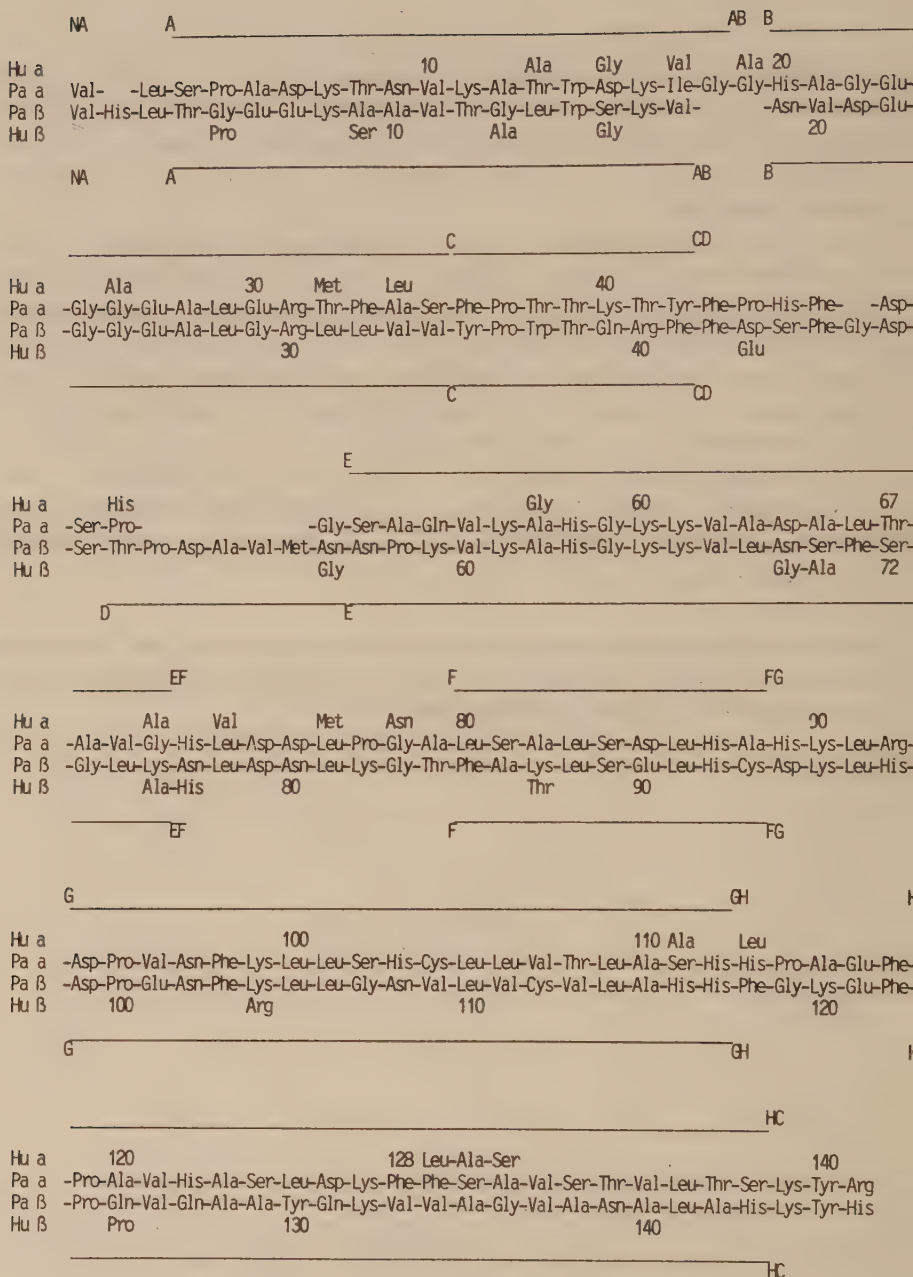


Abb.26a: Die Sequenz der α - und β -Ketten des Hb des Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) im Vergleich zu den Ketten des Human Hb A. Die helikalen Bereiche A-H sind angegeben.

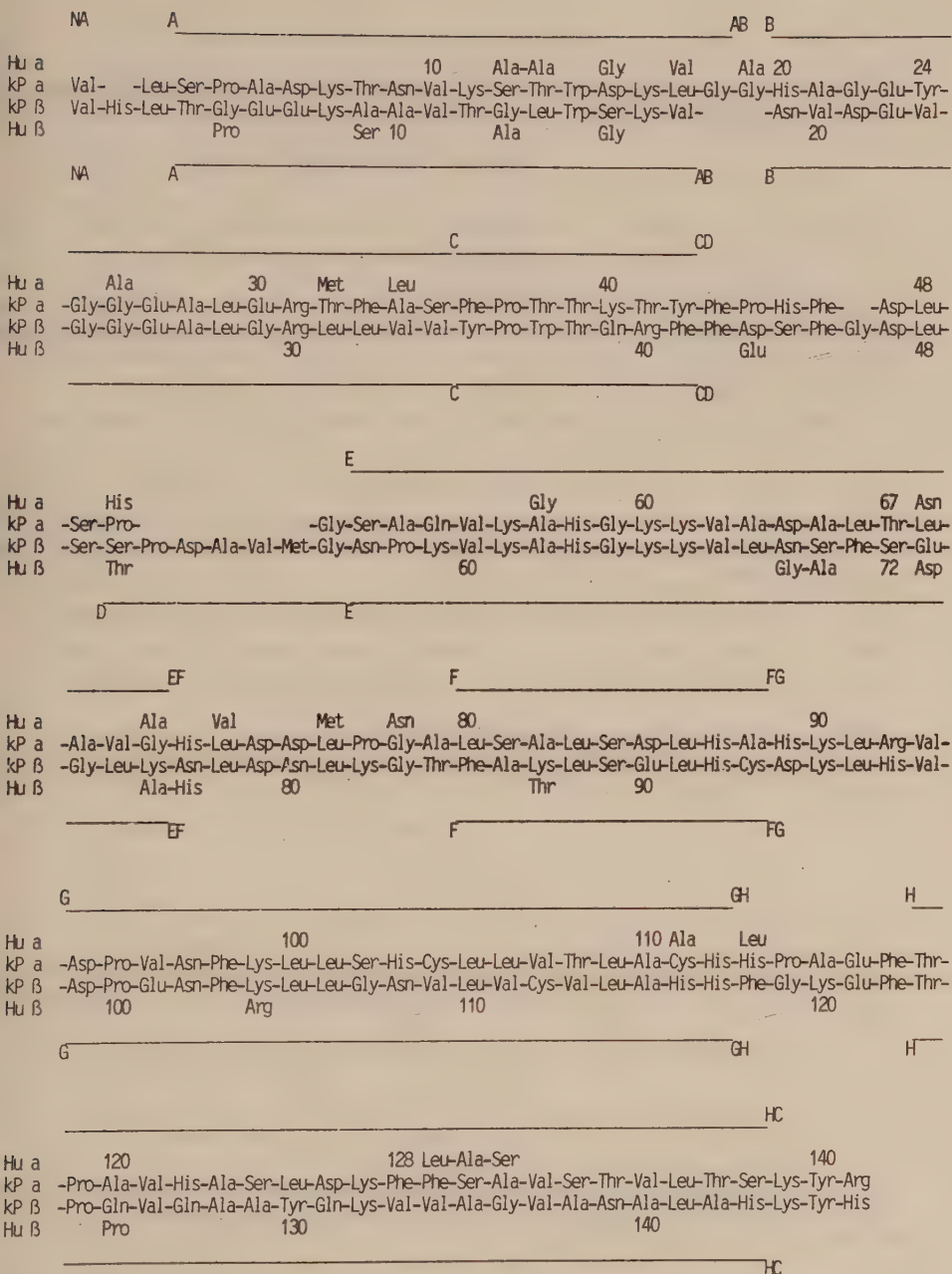


Abb.26b: Die Sequenz der α - und β -Ketten des Hb des Kleinen Panda (*Ailurus fulgens*) im Vergleich zu den Ketten des Human Hb A. Die helikalen Bereiche A-H sind angegeben.

5. Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685

5.1. Isolierung und Prüfung auf Reinheit

Der Inhibitor wurde von Dr. L. Vertesy, Fa. Hoechst Frankfurt, aus der Kulturflüssigkeit von *Streptomyces parvullus* FH-1641 isoliert und wie in 2.1. der Methoden beschrieben aufgearbeitet. In der Triton- und Disk-Elektrophorese wurde die Reinheit des Materials überprüft; nach der Oxidation des Inhibitors (siehe 1.1.5.) zeigte sich in der Triton-Elektrophorese eine intensive und darunter eine schwache Bande. Das oxidierte Material wanderte nur 5% der Länge des Gels, während der native Inhibitor 30% wanderte. Der Grund für die stark verkürzte Wegstrecke liegt in der Öffnung der Disulfidbrücken und der damit verbundenen Denaturierung seiner kompakten Struktur. Die schwache Nebenbande wird erklärt durch die bei der Oxidation auftretende teilweise Hydroxylierung der Tryptophane (siehe 4.2.3.). Aus der Intensität dieser zusätzlichen Bande spiegelt sich das Ausmaß der Veränderung der Indolseitenkette (ca. 10%) wider (Abb.27).



Abb.27: Triton- (2=nativ, 3=oxidiert) und Disk- (1) Elektrophorese von Z-2685

Der Inhibitor hemmt Säuger- α -Amylasen (tight binding Inhibitor). Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes beträgt ca. $K_i=10^{-10}\text{M}$ ⁽³⁷⁾. Um die Wirkung zu verdeutlichen sei ein Beispiel angeführt: Acarbose, ein Oligosaccharid-Inhibitor aus Actinomyceten, zeigt ausgeprägte Hemmung intestinaler α -Glucosidasen von Säugern und besitzt eine Konstante von $K_i=1.3 \times 10^{-6}\text{M}$ ⁽³⁸⁾. Es wurde ein Komplex (1:1 molar) mit pankreatischer Schweine- α -Amylase gebildet, wobei der Inhibitor im molaren Überschuß (50%) zugesetzt wurde. Der Komplex konnte mit der Flachbett-Disk-Elektrophorese (siehe 2.3.) nachgewiesen werden. Die Elektrophorese lief 3 Stunden bei 30 mA (350 Volt) (Abb.28).

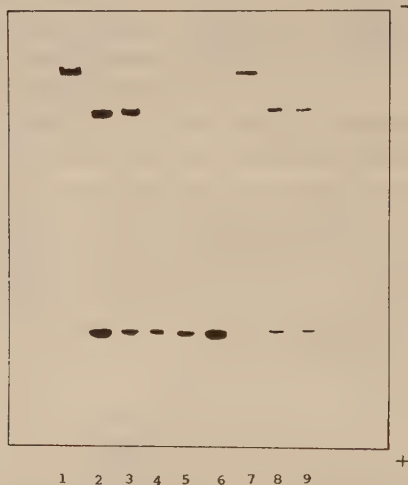


Abb.28: Komplex zwischen Z-2685 und pankreatischer Schweine- α -Amylase (Disk-Elektrophorese)

Bahn 1 und 7 : pankreat. Schweine- α -Amylase (40 nmol, 10 nmol)

Bahn 4, 5, 6 : Inhibitor Z-2685 (10 nmol, 20 nmol, 30 nmol)

Bahn 2, 3, 8, 9 : Komplex (40 nmol, 30 nmol, 20 nmol, 10 nmol)

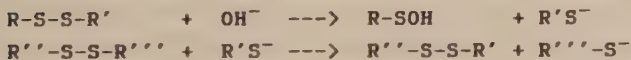
Die α -Amylase reagiert quantitativ mit dem Inhibitor (es ist keine native α -Amylase, dagegen überschüssiger Inhibitor deutlich zu erkennen). Der Komplex wandert weiter als das native Enzym. Z-2685 wandert als saures Protein (isoelektrischer Punkt bei pH 4.4) mit der Front.

5.2. Spaltungsmethoden und Sequenzbestimmung

Wie in 2.4.1. beschrieben wurde die Resistenz des Inhibitors gegenüber Pepsin, das hohe proteolytische Aktivität aufweist, unter verschiedenen Bedingungen getestet. Als Referenzsubstanz wurde Schweine- β -Laktoglobulin, das gut vom Enzym angegriffen wird, in Parallelversuchen unter identischen Bedingungen gespalten. 20% Ameisensäure hatte sich als Lösungsmittel am besten geeignet, da diese stärker denaturiert als Essigsäure. β -Laktoglobulin wurde bereits nach 15 Minuten, der Inhibitor dagegen erst nach 12 Stunden verdaut. Der Inhibitor wurde deshalb 15 Minuten bei 75°C denaturiert und anschließend gespalten. Unter diesen Bedingungen wurde der Inhibitor schon nach 30 Minuten abgebaut.

5.2.1. Tryptische Spaltung

Im Alkalischen besteht die Gefahr, daß Cystine gespalten werden und durch die entstandenen Thiolationen Disulfidaustausche ablaufen.



Es wurde deshalb mit oxidiertem Inhibitor (15 Minuten bei 0°C mit Perameisensäure, siehe 1.1.5.), also mit geöffneten Disulfidbrücken gearbeitet. Nach den in 2.4.1.1. genannten Bedingungen wurde tryptisch gespalten. Auf Grund der Analyse (zwei Arginine) waren drei Peptide zu erwarten. Aus den löslichen Peptiden wurden das N-terminale (Tp 1) und das C-terminale (Tp 3), aus dem Core Tp 2 nachgewiesen. Da es sich um relativ saure Peptide handelte, wurde die HPLC-Trennung im neutralen pH-Bereich bei pH 6.8 mit

NH_4Ac als wässrige Phase durchgeführt.

Für die löslichen Peptide wurde folgendes Gradienten-Programm ausgearbeitet (siehe Abb.29).

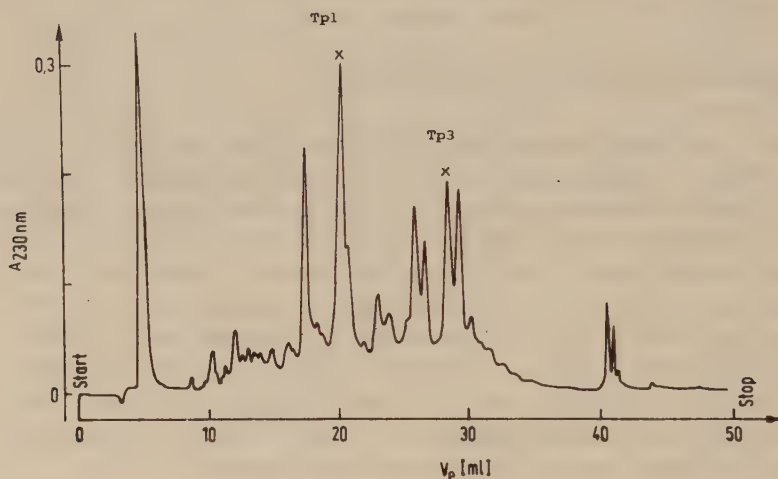


Abb.29: HPLC der löslichen tryptischen Peptide

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 0-10% B in 5 Minuten
 10-28% B " 45 "
 28-60% B " 5 "

Von allen Gipfelfractionen wurden Elektrophoresen und Analysen angefertigt. Da Tp 1 und 2 (und Tp 3 des Cores) in mehreren Gipfeln eluierten (bedingt durch Oxidation der Tryptophane und Cystine), wurden sie auf Vydac RP 18 rechromatographiert (keine Abbildung).

Die in Abb.29 und 30 markierten Gipfel (X) zeigten sowohl bei der Rechromatographie als auch in der Analyse saubere Peptide.

Das Core wurde in verdünntem NH_3 gelöst und ebenfalls über HPLC getrennt (Abb.30:).

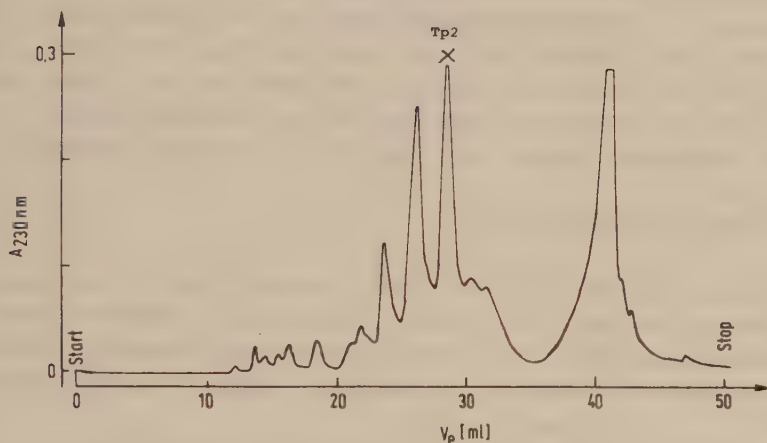


Abb.30: HPLC des Cores

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 0-15% B in 5 Minuten
 15-30% B " 50 "
 30-60% B " 5 "

5.2.2. Sequenz der tryptischen Peptide

Die Sequenzanalyse der tryptischen Peptide bereitete bei der Identifizierung der einzelnen PTH-Derivate keine Probleme. Tp 1, 2 und 3 wurden mit dem Propin-Programm abgebaut unter Zugabe von Polybren (ein Polymer variabler Kettenlänge aus 1.3.Dibrompropan und 2.4.Diaminohexan). Es hat die Eigenschaft, Wechselwirkungen mit Peptiden einzugehen und diese besser an der Glaswand der spinning cup zu adsorbieren. Trotzdem sanken die Ausbeuten der einzelnen Edman-Cyclen gegen Ende des Abbaus von Tp 3 stark ab; deshalb war die genaue Bestimmung des C-Terminus hier nicht möglich.

5.2.3. Peptische Spaltung

Tp 3 der tryptischen Spaltung (50 nmol) wurde wie in 2.4.1.2. beschrieben 15 Minuten mit Pepsin gespalten. Der Ansatz wurde auf HPLC (RP 2) mit 0.05 N NH_4Ac als wässrige Phase getrennt. Es zeigte sich ein komplexes Bild, denn die Spaltung war trotz der kurzen Einwirkzeit unspezifisch und heftig. Trotzdem konnten die Peptide zugeordnet werden. (Die Analysen werden nicht angegeben).

5.2.4. Thermolytische Spaltung

Um überlappende Peptide und die Lage von Disulfiden zu bestimmen, mußte der native Inhibitor gespalten werden. Die Empfindlichkeit der Cystine gegenüber Alkali und die Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen (siehe 5.2.1. und 5.2.) mußten berücksichtigt werden.

Disulfide werden erst durch starke Säuren angegriffen (z.B. 10 N HCl); dabei tritt Disulfidaustausch, katalysiert durch Sulfeniumionen auf:



Es hätte sich daher eine Spaltung mit Pepsin im Säuren angeboten; wegen der geringen Spezifität und einem zu erwartenden komplexen Spaltgemisch (siehe 5.2.3.) wurde aber davon abgesehen.

Als sehr gut geeignet hat sich Thermolysin erwiesen. Es entfaltet seine Aktivität bei höherer Temperatur und zeichnet sich durch selektive Spaltung am N-Terminus von Valin, Leucin und Isoleucin aus. Eine leichte Nebenaktivität ist die Spaltung am N-terminalen Ende aromatischer Aminosäuren. Ein weiterer Vorteil ist, daß das Enzym selbst keine Cysteinreste besitzt⁽³⁹⁾, die bei der Spaltung mit evtl. vorhandenen Cysteinen des Inhibitors zur Bildung von künstlichen Disulfidbrücken führen könnte.

Eine Temperatur von 53°C und eine Spaltzeit von 1 Stunde bei pH 8.0 hat sich als Optimum erwiesen. Der Ansatz wurde wie in 2.5.1. beschrieben chromatographisch getrennt (Abb.31).

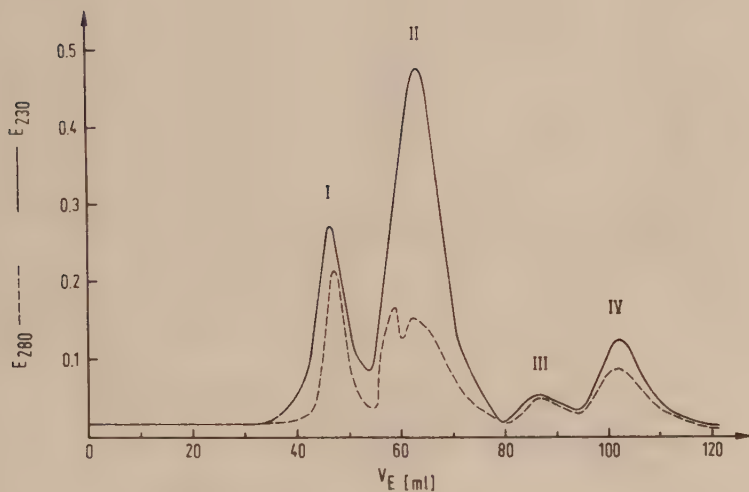


Abb.31: Trennung der thermolytischen Peptide auf Sephadex G25 fine
 Säulelänge : 100 cm (Durchmesser 1.6 cm)
 Elutionsmittel : 0.1 N Essigsäure
 Flußrate : 10 ml/min.

Die Peptide der vier Gipfelfractionen (I-IV) wurden über HPLC (siehe 2.5.2.) getrennt (Abb.32-35).

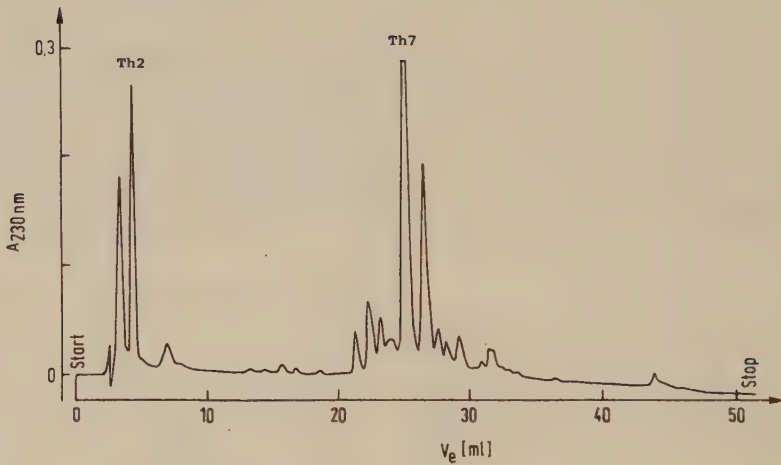


Abb.32: HPLC von Gipfel I der Abb.31.

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 0-40% B in 40 Minuten
 40-60% B " 5 "

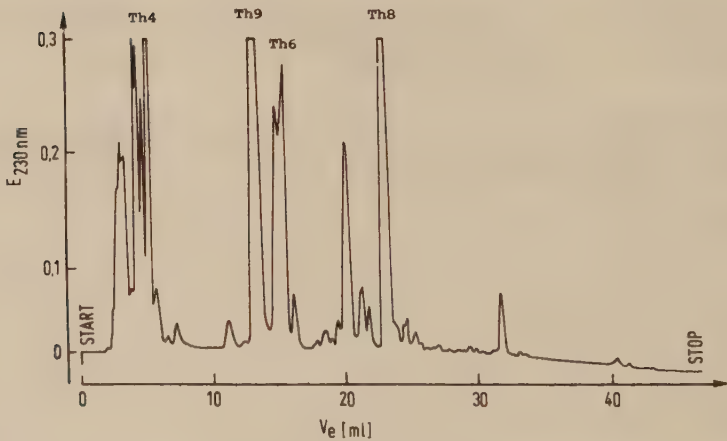


Abb.33: HPLC von Gipfel II der Abb.31.
Bedingungen siehe Abb.32.

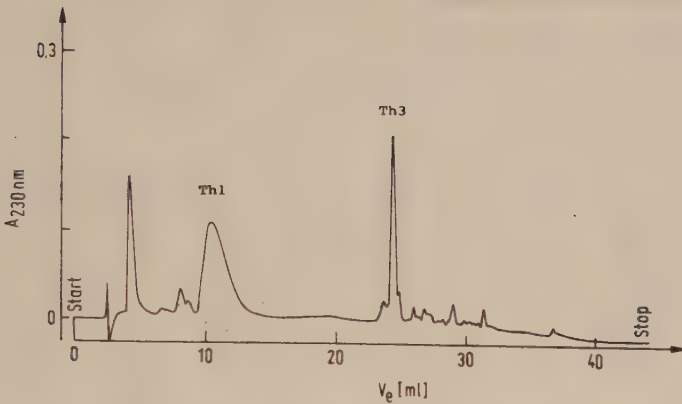


Abb.34: HPLC von Gipfel III der Abb.31.

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 10 Minuten isokratisch
 : 0-60% B in 30 Minuten

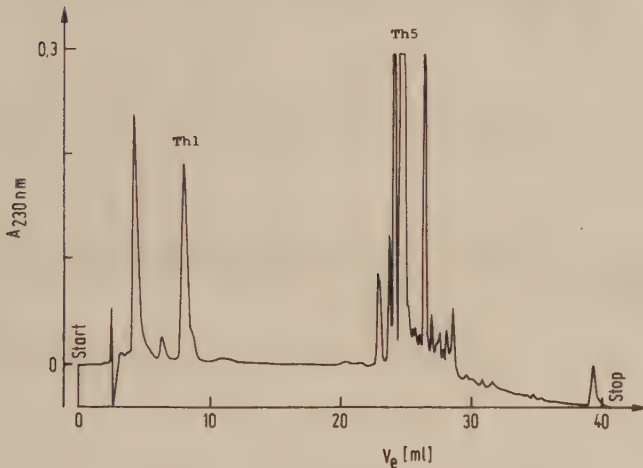


Abb.35: HPLC von Gipfel IV der Abb.31.

Säule : RP 2 LiChrosorb
 wässrige Phase : 0.05 M NH_4Ac
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 10 Minuten isokratisch
 : 0-60% B in 20 Minuten

Die Elektrophorese hatte gezeigt, daß jede Gipfelfraktion nur ein Peptid enthielt. Die Ergebnisse der Analysen (siehe 1.2.4.2.) zeigt Tabelle 9.

Pos.	Th1 1-6	Th2 6-9 22-30	Th3 12-13	Th4 13-15	Th5 16-18	Th6 31-35	Th7 40-44 67-76	Th8 45-51	Th9 57-63
Asx	—	2.02	—	—	—	—	1.03	—	1.98
Thr	1.04	—	—	—	—	1.07	2.01	—	1.01
Ser	0.93	0.86	—	0.89	—	—	0.88	—	—
Glx	—	1.08	—	1.09	—	1.11	—	1.27	—
Pro	1.23	—	—	—	—	—	2.89	1.22	—
Gly	0.95	1.07	—	—	—	—	—	2.44(2)	2.07
Ala	1.18	2.77(3)	—	—	—	—	2.10	—	—
Cys	—	1.65(2)	—	—	—	—	1.82	—	—
Val	0.96	2.23	—	—	—	1.94	—	0.75(1)	—
Met	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ile	—	—	—	—	—	—	—	0.70(1)	—
Leu	—	—	—	—	—	—	1.17	—	—
Tyr	—	—	0.91	—	1.03	0.89	—	—	1.97
Phe	—	—	1.09	1.02	—	—	—	—	—
His	—	0.69(1)	—	—	—	—	1.27	—	—
Trp	—	—	—	—	0.96	—	0.89	1.05	—
Lys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arg	—	—	—	—	1.01	—	1.07	—	—
Total	6	13	2	3	3	5	15	7	7

Tab.9: Analysen der thermolytischen Peptide. In Klammern steht die aus der Sequenzanalyse ermittelte Anzahl der Aminosäuren, sofern die Analysenwerte zu weit abweichen.

5.2.5. Sequenz der thermolytischen Peptide

Die Sequenzanalyse der thermolytischen Peptide erfolgte wie in 5.2.2. beschrieben mit dem Propin-Programm unter Zusatz von 1 mg Polybren. Alle PTH-Derivate konnten zugeordnet werden.

Das Disulfid-Peptid Th 7 wurde ebenfalls sequenziert. Pro Edman-Zyklus wurden zwei PTH-Derivate gefunden. Zur definitiven Absicherung wurde der gesamte erste Schritt massenspektrometrisch untersucht. Da PTH-Aminosäuren flüchtig sind, wurde die Elektronenstoß-Massenspektrometrie angewendet. Die Signale $m/z=248$ (PTH-Leu) und $m/z=321$ (PTH-Trp) waren deutlich zuzuordnen (Abb.36).

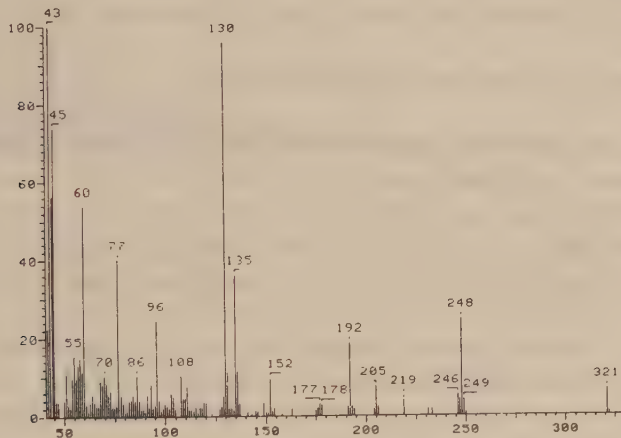


Abb.36: Elektronenstoß-Massenspektrum von Schritt 1 des Edman-Abbaus von Th 7. $m/z=248$ = PTH-Leu und $m/z=321$ = PTH-Trp.

Der vierte Schritt des Abbaus zeigte bei der HPLC-Identifizierung nur einen Gipfel (PTH-Cystin).

Vom sechsten Schritt an wurde nur mehr ein PTH-Derivat analysiert. Das vorletzte PTH-Derivat konnte als Prolin identifiziert werden, während die exakte Bestimmung der C-terminalen Aminosäure dagegen nicht möglich war.

Um die Überlappung zwischen Tp 1 und Tp 2 zu bestimmen, wurde das Tripeptid Th 5 sequenziert. Bei den übrigen thermolytischen Peptiden wurde auf Grund der eindeutigen Analysen-Ergebnisse auf die Sequenzierung verzichtet.

Das Disulfidpeptid Th 2 wurde reduktiv gespalten und über HPLC getrennt. Von beiden Gipfel fraktionen (vor der Spaltung war nur eine Fraktion mit anderer Elutionszeit zu finden) wurden Analysen angefertigt. So konnte das zweite Cystin-Peptid gesichert werden.

5.2.6.FAB-Spektren der thermolytischen Peptide

Das Problem des Auswaschens im Verlauf des Edman-Abbaus (vgl. Tp3 der tryptischen Spaltung, siehe 5.2.2.) war bei den thermolytischen Peptiden von geringer Bedeutung. Dies konnte durch FAB-Spektren zweier Peptide (Th 8 und 9) aufgezeigt werden, die ihre Bruttoformeln bestätigen konnten. Eingesetzt wurden 10 nmol Peptid.

FAB ist eine ideale Ionisationstechnik für schwer oder nicht verdampfbare organische Moleküle wie Peptide, Zucker, Vitamine und Hormone. In der Atomkanone werden durch Beschleunigung der Xenonatome Radikalkationen erzeugt.



In der Stoßkammer treffen die Radikalkationen auf neutrale Xe-Atome; dabei tritt Ladungsaustausch ohne Verlust an Energie auf. Es entsteht ein Strahl schneller Xe^0 -Atome mit hoher kinetischer Energie.



Auf eine dünne Probenschicht, die sich in einer Glycerinmatrix auf einer Kupferspitze befindet, werden die schnellen Xenonatome geschossen; es entstehen Molekül- ($M+H$) und Fragment-Ionen, die beschleunigt, fokussiert und analysiert werden.

Durch Identifizierung des Molekülpeaks konnten die Bruttoformeln von Th 8 (Abb.37) und Th 9 (Abb.38) gesichert werden.



Abb.37: FAB von Th 8 : der Molekülpeak $M+H$ befindet sich bei $m/z=757$. Interessant sind die Fragmentierungen bei $m/z=416$ (=Fragment Pro-Gly-Gly-Trp) und $m/z=342$ (=Fragment Val-Ile-Glu). Es läßt darauf schließen, daß die Bindung zwischen Glu-Pro unter den Bedingungen des FAB leicht fragmentiert. Der peak $m/z=213$ entsteht durch 2 Fragmente: Val-Ile und Pro-Gly-Gly.

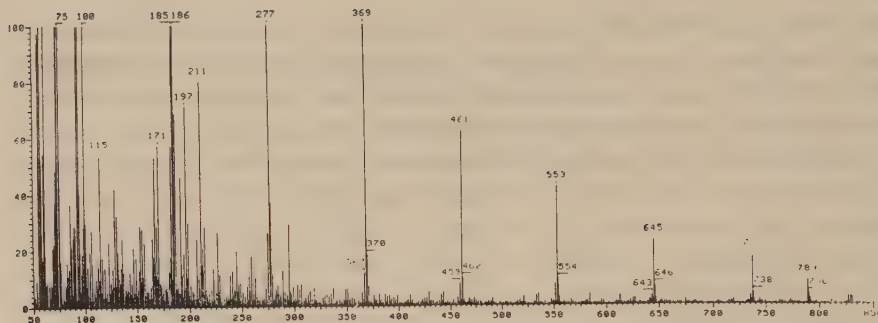


Abb.38: FAB von Th 9 : der Molekülpeak $M+H$ befindet sich bei $m/z=789$. Wegen der geringen Intensität dieses Signals konnten keine weiteren Fragmentationen identifiziert werden. Die intensiven Signale $m/z = (277+92 \times n)$ werden durch die Glycerin-Matrix verursacht. Über den Molekülpeak konnte aber die Bruttoformel des Peptids bestätigt werden.

5.2.7. Asp-Pro-Spaltung

Durch die Sequenzanalyse von Tp 3 wurde am C-terminalen Ende des Inhibitors unerwartet eine Asp-Pro-Bindung entdeckt, die säurehydrolytisch gespalten wurde. Im Gegensatz zu den sonst üblichen denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 6 M Guanidin wurde die Spaltung allein mit 70% Ameisensäure durchgeführt (bei 42°C 68 Std.).

Der Spaltansatz wurde chromatographisch wie in 2.5.1. beschrieben getrennt.

Das Trennbild zeigte zwei Fraktionen mit etwa gleich starker Absorption und nur geringfügig unterschiedlichen Retentionszeiten. Das Dünnschicht-Chromatogramm und die Analysen lieferten keine eindeutigen Ergebnisse. Die weitere Trennung mußte über HPLC erfolgen. Die Schwierigkeit war, ein kurzes Peptid sauber abzutrennen. Als Säulenmaterial bot sich weitporiges Vydac RP 18 an, das sich bei der Rechromatographie der tryptischen Peptide der Bären-Hb als gut geeignet erwiesen hat (siehe 4.2.4.) (Abb.39).

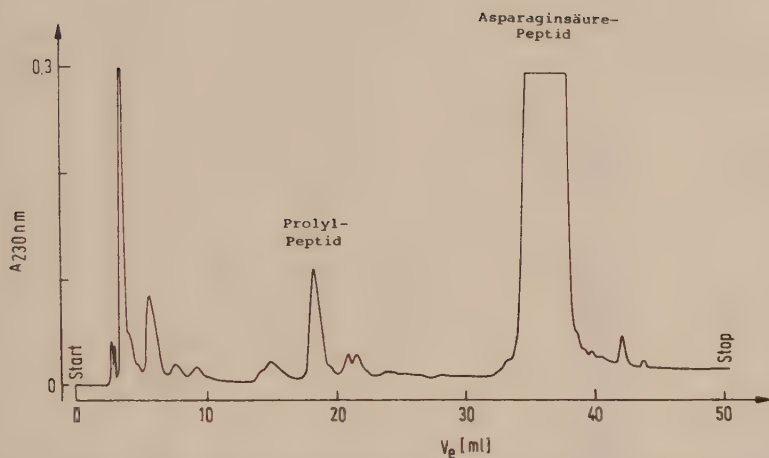


Abb.39: HPLC des Prolyl-Peptids nach der Sephadex-Trennung
 Säule : Vydac RP 18 weitpor
 wässrige Phase : 0.1% TFA
 Flußrate : 1 ml/min.
 Gradient : 5 Minuten isokratisch
 0-40% B in 30 Minuten
 40-60% B " 5 "

In Fraktion 2 der Sephadex-Trennung wurde das Prolyl-Peptid gefunden. Dessen HPLC-Trennung in Abb.39 zeigt das Asparaginsäure-Peptid und deutlich abgetrennt das Prolyl-Peptid.

Dieses wurde wie in 5.2.5. beschrieben sequenziert. Die PTH-Derivate der ersten vier Schritte des Abbaus konnten eindeutig identifiziert werden. Die verbleibende Aminosäure wurde nicht mit Phenylisothiocyanat umgesetzt, sondern mit Wasser aus der cup ausgespült. In der Vakuumzentrifuge wurde die Probe getrocknet und anschließend in Citratpuffer aufgenommen. Die Analyse lieferte ein Serin.

Zusätzlich wurde vom Prolyl-Peptid ein FAB-Spektrum aufgenommen (siehe 5.2.6.). Der Molekülpeak befindet sich bei $m/z=472$; damit wurde die Bruttoformel bestätigt. Die übrigen Fragmentierungen konnten nur unzureichend identifiziert werden (Abb.40).

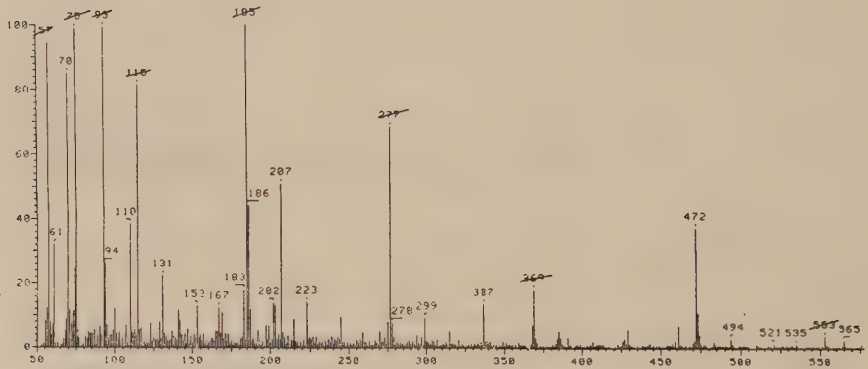


Abb.40: FAB des Prolyl-Peptids. Der Molekülpeak $M+H$ befindet sich bei $m/z=472$.

Die endgültige Bestätigung der C-terminalen Aminosäure Serin lieferte die Hydrazinolyse (siehe 2.6.).

Tabelle 10 zeigt die Analysen der tryptischen Peptide, des Prolyl-Peptids und der Kette des Inhibitors.

Das Schema der Abb.41 faßt die Strategie der Sequenzierung zusammen.

In Abb.42 wird die Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685 dargestellt.

Pos.	Tp1 1-17	Tp2 18-44	Tp3 45-76	Prolyl-Peptid 72-76	Ketten- analyse
Asx	—	2.64(3)	2.93	—	6.43(6)
Thr	1.39	2.67(3)	4.90	1.03	8.88(9)
Ser	1.93	1.20	1.17	1.02	4.01(4)
Glx	3.20	2.44(2)	1.37(1)	—	6.24(6)
Pro	1.28	1.25(1)	2.75(3)	1.89	4.79(5)
Gly	1.30	2.19	6.26(6)	—	9.89(9)
Ala	2.23	3.17	3.09	1.00	7.83(8)
Cys	1.27	1.97	1.23	—	3.84(4)
Val	2.35	3.77(4)	2.29	—	7.64(8)
Met	—	—	—	—	—
Ile	—	—	0.69(1)	—	0.62(1)
Leu	—	—	1.10	—	1.29(1)
Tyr	1.09	1.69(2)	1.72(2)	—	4.95(5)
Phe	0.97	—	1.02	—	2.06(2)
His	—	2.11	1.13	—	3.31(3)
Trp	0.85	0.88	0.89	—	3.00(3)
Lys	—	—	—	—	—
Arg	0.99	0.99	—	—	1.94(2)
Summe	17	27	32	5	76

Tab.10: Analysen der tryptischen Peptide, des Prolyl-Peptids und der Kette des Inhibitors. In Klammern steht die aus der Sequenzanalyse ermittelte Anzahl der Aminosäuren, sofern die Analysenwerte zu weit abweichen.

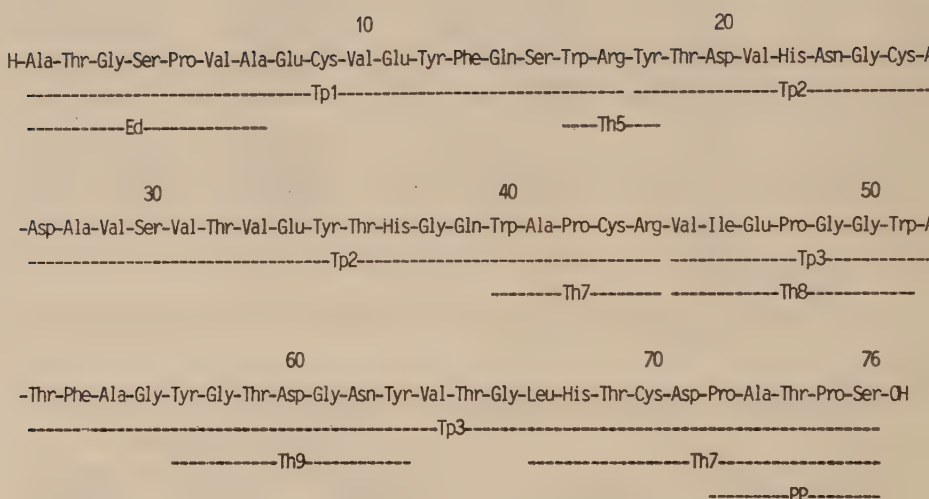


Abb.41: Sequenzier-Schema. Die unterstrichenen Peptide wurden vollständig sequenziert. Ed = sieben Aminosäuren des N-terminalen Teils des nativen Inhibitors wurden sequenziert. Tp = tryptische Peptide. Th = thermolytische Peptide. PP = Prolyl-Peptid.

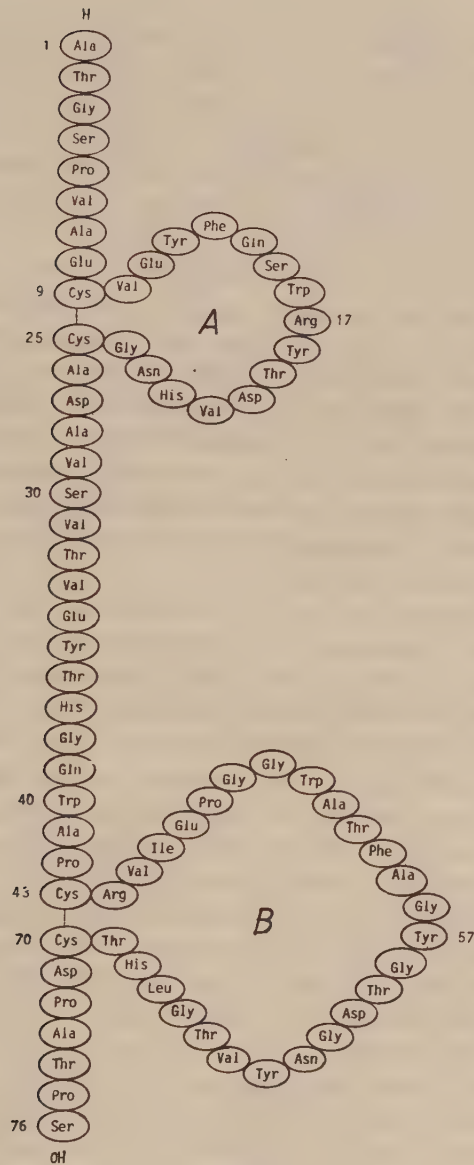


Abb.42: Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685.
Die Disulfidbrücken befinden sich zwischen Cys(9)-Cys(25) und Cys(43)-Cys(70).

D : D I S K U S S I O N

Die Sequenz der Hämoglobine der Bären

6. Struktur und Funktion des Hämoglobins

Häm ist die prosthetische Gruppe von zirkulierenden (Hämoglobin) oder einigen membrangebundenen (Cytochrome) Proteinen: die Funktionen sind O_2 -Transport (Hb), O_2 -Aktivierung beim Metabolismus von endogenen Verbindungen (Steroiden, Fettsäuren, Medikamenten und Carcinogenen) durch Cytochrom P-450 und Elektronen-Transfer bei der zellulären Atmung und Energiebildung. Durch Komplexierung des Eisens mit Protoporphyrin und Apoproteinen wird die katalytische Aktivität des freien Eisens um 5-10 Größenordnungen erhöht.

Hämoglobin ist ein Tetramer aus zwei α - und β -Ketten, mit der Funktion, Sauerstoff zu transportieren. Interessant ist die sigmoide O_2 -Sättigungskurve mit einem Hill-Koeffizienten von 2.8 (beim nicht kooperativen Myoglobin ist der Wert 1). Die O_2 -Affinität wird ausgedrückt in P_{50} : das entspricht dem O_2 -Partialdruck, bei dem Hb mit O_2 halb gesättigt ist. Die bisher höchste gemessene Affinität lag bei 0.533 Pascal, gefunden beim Hb von Ascaris (vgl. bei Human-Hb 3466 Pascal), die niedrigste bei 133300 Pascal beim Hb von Fischen (bei niedrigem pH). Diese bis zu 250000 fachen Unterschiede zeigen eindrucksvoll, daß der Eiweißanteil einen entscheidenden Einfluß auf die Affinität des Häm-Eisens ausübt. Beim Hb des Menschen kann unter physiologischen Bedingungen ein 500 facher Anstieg der O_2 -Sättigung beobachtet werden. In der Lunge herrscht ein höherer O_2 -Partialdruck vor; dabei kommt es zur O_2 -Aufnahme; im Gewebe wird bei niedrigem Druck der O_2 abgegeben. Unter physiologischen Bedingungen findet permanent ein Übergang zwischen Oxy- und Deoxyform statt. Beide Formen besitzen physikalisch-chemische Charakteristika. Deoxy-Hb enthält ein fünffach koordiniertes Fe-Zentralatom in einem high spin Komplex (T-Struktur); es zeigt

deshalb paramagnetische Eigenschaften. Im Oxy-Hb ist das Fe sechsfach koordiniert, liegt als low spin Komplex vor (R-Struktur) und ist diamagnetisch⁽⁴⁰⁾.

Die Funktion des Hämoglobins wird durch allosterische Effektoren moduliert. Organische Phosphate senken (bei Säugern 2,3.-DPG) die O_2 -Affinität tetramerer Hb, indem sie die T-Struktur stabilisieren.

Wichtige Bereiche des Hb-Moleküls sind Häm-, $\alpha_1\beta_1$ -, $\alpha_1\beta_2$ -, DPG-Bindungsstellen und Aminosäuren, die für den Bohr-Effekt verantwortlich sind.

Es läßt sich ein System in deren Anordnung auf den Genen erkennen. Im zweiten Exon eines jeden Globin-Gens befinden sich fast alle Häm- und $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen. Das erste und dritte Exon enthält alle $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen und die für den Bohr-Effekt verantwortlichen Aminosäuren. Je vier DPG-Bindungsstellen⁽⁴¹⁾ befinden sich in den β -Ketten, wobei je eine bzw. zwei pro Exon zu finden sind.

6.1. Bindungsstellen von Deoxy-Hämoglobinen

In den Tabellen 11-13 sind die Bindungsstellen von Deoxy-Human-Hb aufgelistet. Die Austausche gegenüber denen der Bären-Hämoglobine sind angegeben.

Tab.11: Häm-Bindungsstellen

α		Hb-Hu	Hb-Bären	Hb-Hu		β
42	C7	Tyr		Phe	C7	41
43	CD1	Phe		Phe	CD1	42
45	CD3	His		His	E7	63
46	CD4	Phe		Lys	E10	66
58	E7	His		Val	E11	67
61	E10	Lys	Ser	Ala	E14	70
62	E11	Val		Phe	E15	71
66	E15	Leu		Phe	F1	85
80	F1	Leu		Leu	F4	88
83	F4	Leu		Leu	F7	91
86	F7	Leu		His	F8	92
87	F8	His		Leu	FG3	96
91	FG3	Leu		Val	FG5	98
93	FG5	Val		Asn	G4	102
97	G4	Asn		Phe	G5	103
98	G5	Phe		Leu	G8	106
101	G8	Leu		Val	H15	137
132	H15	Val		Leu	H19	141
136	H19	Leu				

Die Häm-Bindungsstellen⁽⁴²⁾ (Tab.11) in den α -(19) bzw. β -Ketten(18) befinden sich im Innern des Moleküls und stellen fast ausschließlich hydrophobe Aminosäuren dar. Die Hb der Bären zeigen nur einen Austausch in ihren β -Ketten: $\beta 70$ (E 14) Ala--->Ser; dieser Austausch wird häufig in β -Ketten der Säuger gefunden. Die Bindungsstellen der α -Ketten entsprechen denen von Hb-Human.

Tab.12: $\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen

α		Hb-Hu	Hb-Bären	Hb-Hu		β
37	C2	Pro		His	HC3	146
38	C3	Thr		Tyr	HC2	145
40	C5	Lys		Leu	G7	105
41	C6	Thr		Asn	G4	102
42	C7	Tyr		Glu	G3	101
44	CD2	Pro		Asp	G1	99
88	F9	Ala		Val	FG5	98
91	FG3	Leu		His	FG4	97
92	FG4	Arg	Asp	Glu	CD2	43
94	G1	Asp		Phe	C7	41
95	G2	Pro		Arg	C6	40
96	G3	Val		Trp	C3	37
97	G4	Asn		Pro	C2	36
140	HC2	Tyr		Tyr	C1	35
141	HC3	Arg		Val	B16	34

$\alpha_1\beta_2$ -Bindungsstellen⁽⁴³⁾ (Tab.12), die für die Tetrameren-Bildung verantwortlich sind, sind ebenfalls sehr konstant, da es sonst zu veränderten Häm-Häm-Wechselwirkungen und damit zu einer Beeinträchtigung der Atmungsfunktion kommen kann. In den β -Ketten liegt ein konservativer Austausch in $\beta 43$ (CD 2) Glu--->Asp vor. Die Bindungsstellen der α -Ketten sind mit denen von Human-Hb identisch.

Tab.13: $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen

α		Hb-Hu	Hb-Bären	Hb-Hu		β	
31	B12	Arg		Gln	H9	131	
34	B15	Leu	Ala	Ala	H6	128	
35	B16	Ser		Gln	H5	127	
36	C1	Phe		Gln	Pro	H3	125
103	G10	His			Pro	H2	124
106	G13	Leu			Thr	H1	123
107	G14	Val			Phe	GH5	122
110	G17	Ala			Gly	GH2	119
111	G18	Ala	Ser	Cys	His	G18	116
114	GH2	Pro			Ala	G17	115
117	GH5	Phe			Cys	G14	112
118	H1	Thr			Asn	G10	108
119	H2	Pro			Met	D6	55
122	H5	His			Tyr	C1	35
123	H6	Ala			Val	B16	34
126	H9	Asp			Val	B15	33
					Arg	B12	30

Die für die Dimerenbildung wichtigen $\alpha_1\beta_1$ -Bindungsstellen⁽⁴³⁾ (Tab.13) sind relativ variabel. Man findet in den α Ketten zwei Austausche : $\alpha 34$ (B 15) Leu--->Ala; $\alpha 111$ (G 18) Ala--->Cys beim Hb des Kleinen Panda bzw. Ala-->Ser bei den Hb von Panda, Kragen- und Malaienbär. In den β -Ketten ist nur $\beta 125$ (H 3) Pro--->Gln ausgetauscht.

Man kann davon ausgehen, daß Human- und Bären-Hb ähnliche physiologische Eigenschaften zeigen, da die Austausche konservativ sind.

2.3.-DPG tritt nur mit β -Ketten in Wechselwirkung. Die vier Bindungsstellen bei Säuger-Hb sind:

β NA 1 : Val	β EF 6 : Lys
β NA 2 : His	β H 21 : His

Die Einordnung der Säuger-Hb in zwei Gruppen nach Bunn⁽⁴⁴⁾ beruht auf Austauschen dieser Bindungsstellen.

a) Einige wenige Hb mit niedriger intrinsischer O_2 Affinität zeigen keine Abhängigkeit von organischem Phosphat. Hier ist

meist β NA 1 deletiert und an β NA 2 Methionin zu finden (z.B. bei Rind, Schaf, Ziege).

- b) Hb mit hoher intrinsischer O_2 -Affinität werden durch 2,3.-DPG moduliert. Vertreter dieser Gruppe sind die Hämoglobine von Mensch, Bär und den meisten Säugern.

Auf Grund neuer Ergebnisse läßt sich eine dritte Gruppe beschreiben:

- c) Hb mit niedriger intrinsischer O_2 -Affinität bei hoher Affinität des Gesamtblutes (z.B. bei Lama⁽⁴⁵⁾, Gürteltier⁽⁴⁶⁾, Elefant^(46,47), Rhinoceros⁽⁴⁶⁾, fötalem Human-Hb⁽⁴⁵⁾). Durch Mutation einer Phosphat-Bindungsstelle (meist $\beta 2$) kommt es zur Reduktion der Phosphat-Hämoglobin-Wechselwirkung.

Neben 2,3.-DPG sind weitere heterotrope Liganden bekannt wie H^+ (Bohr-Effekt), Cl^- und CO_2 . Sie erniedrigen ebenfalls die O_2 -Affinität des Moleküls.

6.2. Vergleich mit abnormalen menschlichen Hämoglobinen

Beim Vergleich mit abnormalen menschlichen Hb wurde ein interessanter Austausch entdeckt:

$\beta 87$ (F3) Thr--->Lys, Hb-D-Ibadan⁽⁴⁸⁾.

Hb-D in Kombination mit Hb-S verhindert die Sichelzellanämie. Die zusätzliche polare Gruppe zwischen zwei Hämkontakten ($\beta 85$ Phe und $\beta 88$ Leu) beeinflußt aber nicht die Funktion des Hams.

7. Einordnung der Pandas und Systematik der Raubtiere (Carnivora)

Die systematische Stellung und die Stammesgeschichte des Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) sind seit seiner Entdeckung und Beschreibung im Jahre 1869⁽⁴⁹⁾ unklar geblieben. Dies gilt ebenso für den Kleinen Panda, von dem aber weit weniger geschrieben wird, da er nicht vom Aussterben bedroht ist wie sein großer Bruder. Die Verbreitung des Panda ist auf einige wenige zentralchinesische Provinzen beschränkt, wo er in Bergwäldern in Höhen von 2500–3500m lebt. Er stellt kein lebendes Fossil dar, sondern vielmehr eine hochspezialisierte Spezies und wird in China als lebendes Nationalheiligtum verehrt. Obwohl er in die Familie der Raubtiere (Carnivora) eingereiht wird, ernährt er sich bevorzugt vegetarisch von Bambusblättern. Drei Theorien seiner Einordnung innerhalb der Ordnung der Raubtiere, basierend auf Verhaltensstudien und Untersuchungen an Fossilien (Anatomie von Gebissen und Skeletten), werden diskutiert.

- Davis bezeichnet in seinem Buch "The Giant Panda" den Panda als spezialisierten Bären und ordnet ihn den echten Bären (Ursidae) zu⁽⁵⁰⁾.
- Morris sieht den Panda als spezialisierten Kleinbären (Familie der Procyonidae)⁽⁵¹⁾.
- Ewer und Eisenberg wie auch Thenius fordern für den Panda eine eigene Familie innerhalb der Carnivora, die der Ailuropodidae (52,53,54).

1985 erschien in der Nature⁽⁵⁵⁾ die Arbeit "Die Lösung des Rätsels um den Panda". Der Autor O'Brien führt für die von ihm vorgelegte Systematik vier Belege an:

a) Ergebnisse der DNA-Hybridisierung

DNA aus Zellkernen von Bären wurde extrahiert, radioaktiv markiert und mit DNA einer anderen Spezies hybridisiert. Die

Unterschiede in der Schmelztemperatur der Heteroduplices dienten als Maß für die Homologie.

b) Untersuchungen mit Isoenzymen

Von 36 verschiedenen löslichen Enzymen und Isoenzymen wurde der Grad der Substitution der Allele elektrophoretisch untersucht und statistisch ausgewertet.

c) Serodiagnostik

Es wurden Ergebnisse von Sarich⁽⁵⁶⁾ herangezogen, der Antikörper gegen Albumin und Transferrin des Panda mit den entsprechenden Enzymen anderer Bären reagieren ließ. Die homologen Proteine präzipitierten in unterschiedlichem Ausmaß. Der Panda wurde den Ursidae, also den Großbären zugeordnet. Für den Kleinen Panda widersprechen sich die Daten: nach den Albuminen steht er genau zwischen Ursidae und Procyonidae, nach den Transferrinen näher den Ursidae.

d) Cytogenetische Befunde

Die Anzahl der Chromosomen war für Panda (44 metazentrische) und Braunbär (74 acrozentrische) deutlich unterschiedlich, die Autoren entdeckten aber ausgeprägte Ähnlichkeit in deren Morphologien.

Auf Grund dieser Kriterien wird gefolgert, daß der Panda ein Vertreter der Ursidae ist, wobei eine Unterfamilie der Bären (Ailuropodinae) postuliert wird. Der Kleine Panda wird vorsichtiger zu den Procyonidae, also den Kleinbären gestellt.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Sequenzen der Hb von Kragenbär (*Ursus tibetanus*), Malaienbär (*Helarctos malayanus*), Kleinem Panda (*Ailurus fulgens*) und Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) sollen beitragen, die Stellung der Pandas innerhalb der Carnivora durch vergleichende Untersuchungen zu präzisieren. Dadurch ist die Aufstellung eines Stammbaumes und eine genaue Einordnung möglich. Weiterhin kann die Zeit der Divergenz mit relativ großer Genauigkeit abgeschätzt werden.

7.1. Evolution der Globin-Gene

Vor etwa 425-500 Millionen Jahren wurde das Urgen der Globine dupliziert und vor 300-350 Millionen Jahren trennten sich die α - und β -Gene auf verschiedene Chromosomen^(57,58). Zu dieser Zeit haben sich die Säuger von Reptilien und Vögeln getrennt. Die Duplikation der α -Gene erfolgte vor 300 Millionen Jahren. Vor 90 Millionen Jahren existierte die Urform der Säuger-Globin-Gene, aus der die heute existierenden Gencluster entstanden sind.

Abb.43 zeigt alle derzeit bekannten α ⁽⁵⁹⁾ und β ⁽⁶⁰⁾-Gene des Menschen.



Abb.43: α - und β -Gencluster des Menschen

Jedes Gen zeigt eigene Kontrollbereiche der Transkription am 5'-Ende (TATA-Box, CAAT-Box, CACA-Box) und die Terminationssignale am 3'-Ende.

und die Terminationssignale am 3'-Ende.

Die Evolution verlief nach Zuckerkandl und Pauling⁽⁶¹⁾ divergent in konstanten Raten. Goodman⁽⁵⁸⁾ nimmt dagegen nur für die vergangenen 300 Millionen Jahre eine konstante Rate an ("molekulare Uhr"). Für den Austausch einer Aminosäure fordert Goodman⁽⁶²⁾ eine Zeit von 1.5 Millionen Jahren, Kimura⁽⁶³⁾ von 1 Million Jahre. Wilson⁽⁶⁴⁾ gibt für die Globin-Ketten unterschiedliche Werte an: für die α -Ketten 1.2 Millionen und für die β -Ketten 1.1 Millionen Jahre. Die Unterscheidung berücksichtigt die Tatsache, daß bei Säugern meist mehr Austausche in den β -Ketten gefunden werden (Ausnahme bei Kaninchen und Hund). Die Verhältnisse bei Vögeln sind jedoch umgekehrt.

7.2. Molekularbiologische Interpretation der Sequenzen

In den Abbildungen 44a und b werden die Sequenzen der α - und β -Ketten des Hb des Panda gegen die der Hb des Kleinen Panda, Malaienbär und Kragenbär verglichen. Zusätzlich werden die Sequenzen der α - und β -Ketten des Hb des Waschbären⁽⁶⁵⁾, einem Vertreter der Kleinbären, herangezogen.

Für die nachfolgenden Berechnungen wird für den Austausch einer Aminosäure eine Zeit von 1.5 Millionen Jahren angenommen, entsprechend den Vorschlägen von Goodman (siehe 7.1.). Das Hb des Panda zeigt in den α -Ketten vier, in den β -Ketten zwei Unterschiede im Vergleich zu denen des Hb des Kleinen Panda. Beide haben sich demnach vor etwa 9 Millionen Jahren voneinander getrennt. Dies entspricht der Zeit, die Paläontologen für die Differenzierung in Braun- und Schwarzbär-Stämme fordern⁽⁶⁶⁾. Die folgenden Tabellen 14 und 15 zeigen die Austausche in den α - und β -Ketten der untersuchten Hämoglobine und denen des Waschbären sowie deren Umrechnung in paläontologische Daten.

Tab.14: Austausche in den α -/ β -Ketten der Hb von Panda, Kleinem Panda, Kragenbär und Waschbär.

	Panda	Kl. Panda	Kragenbär Malaienbär	Waschbär
Panda	---	4/2	4/7	7/13
Kl. Panda	4/2	---	8/7	7/11
Kragenbär Malaienbär	4/7	8/7	---	10/11
Waschbär	7/13	7/11	10/11	---

Tab.15: Abschätzung der Abspaltung von Panda, Kleinem Panda, Kragenbär und Waschbär in Millionen Jahren.

	Panda	Kl. Panda	Kragenbär Malaienbär	Waschbär
Panda	---	9	16.5	30
Kl. Panda	9	---	22.5	27
Kragenbär Malaienbär	16.5	22.5	---	31.5
Waschbär	30	27	31.5	---

Die Werte zeigen, daß die Hb von Panda und Kleinem Panda die geringsten Unterschiede in den Sequenzen ihrer α - und β -Ketten aufweisen. Beide stehen den Ursidae (Kragen- und Malaienbär) näher als den Procyonidae (Waschbär).

Ein weiterer Vertreter der Ursidae, der Eisbär⁽⁶⁷⁾, zeigt ebenfalls mit den Hb von Kragen- und Malaienbär identische Primärstruktur. Das bedeutet, daß die einzelnen Vertreter der Familie der Ursidae so nah verwandt sind wie Mensch, Schimpanse und Bonobo (siehe 7.5. und 7.6.).

7.3. Vergleich mit der paläontologischen Datierung

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung stimmen sehr gut mit Fossilfunden überein. Im jüngeren Mittel-Miozän (vor ca. 12-15 Millionen Jahren) hat sich die Abspaltung des Panda von der Linie der Großbären vollzogen. Thenius⁽⁵⁴⁾ bezeichnet den Panda deshalb als entfernten Verwandten der Ursidae und hält eine Abtrennung in eine eigene Familie (Ailuropodidae) für nötig (dies hatte 1921 schon Pocock⁽⁶⁸⁾ gefordert). Procyonidae (Kleinbären) und Ursidae (Großbären) trennten sich bereits vor annähernd 35 Millionen Jahren (siehe auch Abb.46).

Die einzige Diskrepanz mit Fossildaten zeigt sich bei der Verwandtschaft zwischen Panda und Kleinem Panda. Thenius schließt, daß Kleiner Panda und Ursidae schon vor 20 Millionen Jahren voneinander getrennt waren. Allerdings fordert er für den Kleinen Panda eine eigene Familie innerhalb der Procyonidae und bestätigt, daß sich Panda und Kleiner Panda karyologisch sehr ähnlich sind (im Gegensatz zu O'Brien). Thenius beobachtet weiter, daß Muskulatur, Gefäßsystem und Respirationsapparat weitgehend den Bären entsprechen, dagegen Kauorgane, Verdauungstrakt und Genitalapparat wie beim Kleinen Panda angelegt sind. Der Autor führt dies auf ähnliche Ernährungsweise und auf Konvergenz zurück.

7.4. Mathematische Auswertung der Sequenzen mit der maximum parsimony Methode

Eine detaillierte Auswertung der Sequenzen der Bärenhämoglobine lieferte die Analyse nach der maximum parsimony Methode^(57,69,70) von Goodman. Sie wurde durchgeführt, um die Einordnung der Pandas innerhalb der Raubtiere (Carnivora) zu präzisieren.

Die Methode arbeitet mit der größtmöglichen Homologie infolge Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren (orthologe Sequenzen). Entsprechend den Prinzipien der maximum parsimony Methode entsteht der die Wirklichkeit am besten beschreibende Stammbaum durch die geringst möglichen Nukleotidaustausche.

Goodman geht bei der Aufstellung des Stammbaumes wie folgt vor:

Die Aminosäure-Sequenz wird entsprechend den Vorschlägen von Fitch und Margoliash⁽⁷¹⁾ in Codon-Sequenzen übersetzt, einschließlich aller möglicher synonymen Codons. Durch ein Programm werden diejenigen Codons berechnet, welche die Mutationen für alle untersuchten Sequenzen minimieren: es kann daher vorkommen, daß für dieselbe Aminosäure verschiedene Codons vorliegen. Durch diesen Ansatz wird die Verwandtschaft durch Rück- und Parallel-Mutationen so wenig wie möglich verdeckt.

Mit einem weiteren Programm wird in erster Annäherung ein Stammbaum als Ausgangsbasis aufgestellt. Durch Wiederholung der Rechenoperationen gelangt man schließlich asymptotisch zu einem Stammbaum mit den geringsten "Längen" der sich abgabelnden Dendriten. Schließlich wird das Ergebnis durch ein weiteres Programm überprüft^(69,72).

Anwendung an Vertretern der Carnivora

Der in Abb.45 gezeigte Stammbaum wurde nach der eben beschriebenen Methode von Goodman berechnet⁽⁷³⁾. Die Zahlen an den Verzweigungen geben die minimalen Nukleotidaustausche an.

Die Auswertung basiert auf Daten von 13 Vertretern der Carnivora und läßt deshalb sehr detaillierte Schlüsse zu. Neben den Hämoglobinen wurden in einigen Fällen zusätzlich die Sequenzen

von Myoglobin, Cytochrom c, Augenlinsen- α -crystallin und Fibrinopeptiden A und B berücksichtigt; man spricht von einem tandem alignment.

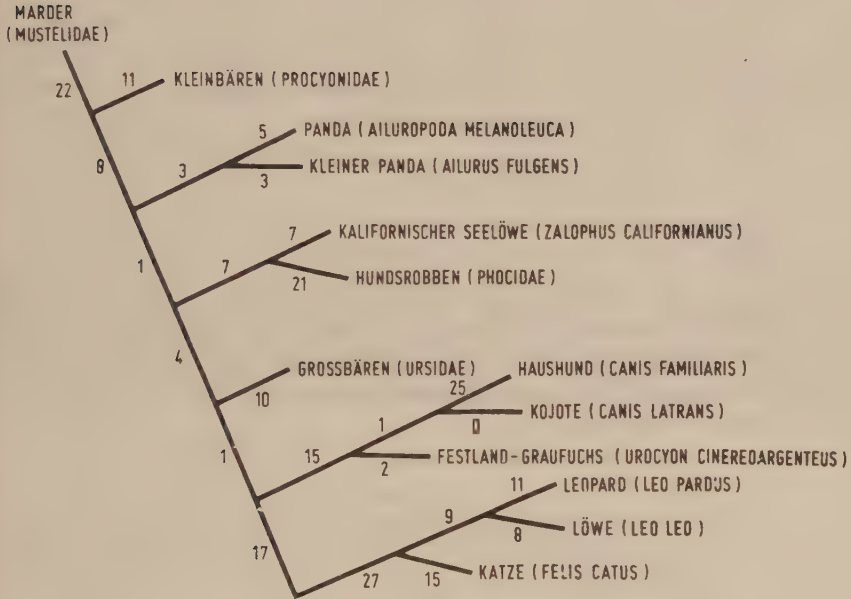


Abb.45: Stammbaum der Carnivora berechnet aus Daten von Protein-, hauptsächlich von Hämoglobin-Sequenzen nach der maximum parsimony Methode. Die Stellung der Pandas konnte besonders genau erarbeitet werden (73).

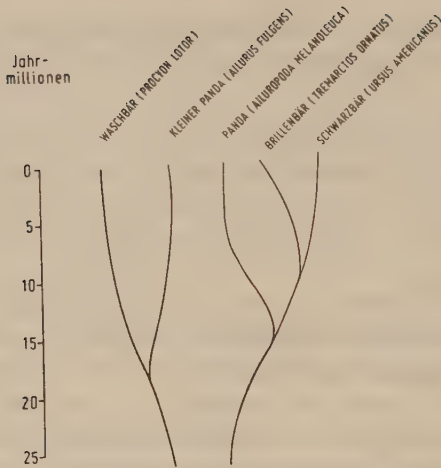


Abb.46: Stammbaum der Bären nach paläontologischen Daten⁽⁵⁴⁾. Der Panda spaltete sich von der Linie der Großbären vor ca. 15 Millionen Jahren ab, während sich der Kleine Panda vor ca. 20 Millionen Jahren von der Linie der Kleinbären trennte. Auf Grund der Fossildokumente hat sich die Trennung in Klein- und Großbären vor mehr als 30 Millionen Jahren vollzogen.

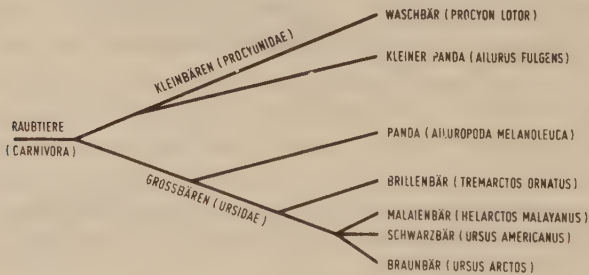


Abb.47: Stammbaum der Bären nach O'Brien⁽⁵⁵⁾. Deutlich wird die Einordnung des Kleinen Panda in die Familie der Kleinbären und des Panda in die Familie der Großbären.

Wie aus der Abbildung 45 ersichtlich trennen sich von der Linie der Carnivora zuerst die Felidae (Katzen) als Familie ab. Es folgen die Canidae (Hunde) und die Ursidae (Großbären). Noch vor den beiden Pandas gabeln sich die Phocoidae (Hundsrobben) und Otariidae (Kalifornischer Seelöwe) ab. Schließlich trennen sich die Procyonidae (Kleinbären) und Mustelidae (Marder).

Aus der Abbildung 45 geht hervor, daß sich für Panda und Kleinem Panda die Einordnung in eine eigene Familie anbietet. Aus den Zahlen der minimalen Nukleotidaustausche ist zu erkennen, daß die beiden Pandas den Großbären (Ursidae) näher stehen als den Kleinbären (Procyonidae).

Um die gegensätzlichen Ergebnisse aus den Hb-Daten, den paläontologischen von Thenius⁽⁵⁴⁾ und denen von O'Brien darzustellen, sind in den Abbildungen 45, 46 und 47 die Stammbäume einander gegenübergestellt. Deutlich wird in Abb.47 die Einordnung des Panda in die Familie der Bären, während der Kleine Panda in die Familie der Kleinbären eingereiht wird (siehe Einleitung).

7.5.Zusammenfassung und Diskussion der Daten

Der Zeitpunkt der Abspaltung des Panda von der Bärenlinie stimmt nach den Hb-Daten (16.5 Mill. Jahre) und den Ergebnissen von O'Brien⁽⁵⁵⁾ (15-25 Mill. Jahre) weitgehend überein. Deutliche Diskrepanzen bestehen bezüglich der Einordnung des Kleinen Panda. Die geringe Austauschrate in dessen Hb-Sequenz (nur sechs Austausche im Vergleich zum Hb des Panda) mag folgende Ursache haben: beide ernähren sich vegetarisch im Gegensatz zu allen anderen Bären, sind auf asiatische Lebensräume begrenzt und waren deshalb einem ähnlichen Selektionsdruck ausgesetzt.

Zu denken wäre ebenfalls an eine verminderte Evolutionsrate der Globine beider Pandabären, wie sie bei den Primaten gefordert wird⁽⁷⁴⁾. Mensch, Schimpanse und Bonobo haben sich vor 4-5 Mill. Jahren voneinander getrennt und sollten demnach 3 Austausche in ihren Globinen aufweisen. Tatsächlich aber besitzen sie identische α - und β -Ketten (siehe 7.6.).

Die Auswertung der Sequenzen der vier Hämoglobine läßt sich wie folgt zusammenfassen: die Familie der Großbären stellt eine sehr einheitliche Gruppe dar, deren Vertreter sich vor weniger als fünf Millionen Jahren trennten.

Nach meinen Ergebnissen muß der Panda zusammen mit dem Kleinen Panda in eine eigene Familie (Ailuropodidae) eingeordnet werden, die sich von der Linie der Ursidae und Procyonidae abtrennte.

7.6. Identische Hämoglobine

Das Ergebnis identischer α - und β -Ketten der Hb dreier Bären ist interessant und zeigt sich ebenfalls zwischen den Hb von Mensch, Schimpanse und Bonobo. Im einzelnen gibt folgende Tabelle die heute bekannten Beispiele identischer Ketten von Hämoglobinen.

Tab.16: Identische Ketten von Hämoglobin

Species	identische Ketten
Human, Pan paniscus, Pan troglodytes ⁽⁷⁴⁾	α , β ,
Human, Pan troglodytes ^(75,76)	γ
Camelus dromedarius und Camelus ferus bactrianus ⁽⁷⁷⁾	α , β
Lama glama, Lama vicugna und Lama pacos ⁽⁷⁸⁾	β
Bos primigenius, Bos grunniens ⁽⁷⁹⁾	γ
Branta canadensis, Cygnus olor ⁽⁸⁰⁾	β
Gyps rueppellii, Aegypius monachus ⁽⁸¹⁾	β
Ursus maritimus, Ursus thibetanus und Helarctos malayanus ⁽⁶⁷⁾	α , β
Chironomus thummi thummi (CTT) ⁽⁸²⁾	I, Ia
Chironomus thummi thummi (CTT) und Chironomus thummi piger (CTP) ⁽⁸³⁾	III

8. α -Amylase-Inhibitor Z-2685

Der α -Amylase-Inhibitor Z-2685 aus *Streptomyces parvullus* FH-1641 (ATCC 31209) gehört einer neuen Klasse von α -Glucosidase-Inhibitoren mikrobiellen Ursprungs an. Er ist ein sekretorisches Exoprotein mit einem Molekulargewicht von 8129 Da, das aus 76 Aminosäuren aufgebaut ist.

Der Inhibitor Z-2685 ist von großem Interesse, da er möglicherweise bei der Therapie von Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperlipoproteinämie eingesetzt werden kann. Er ist gegenüber enzymatischem Abbau resistent und kann daher bei oraler Verabreichung im Dünndarm zu seiner vollen Wirkung kommen, da er nicht schon durch die Enzyme des Magens abgebaut wird.

Der Inhibitor hemmt die Verdauung von Stärke im Darmtrakt. Die Folge ist, daß die Bildung von Glucose und damit dessen Passage durch die Darmwand und der Übertritt ins Blut deutlich verzögert wird. Damit wird ein zu starker Anstieg des Blutzuckers nach Mahlzeiten verhindert. Die Stoffwechsellage bei Diabetes-Patienten wird dadurch entscheidend verbessert; Dauerschäden lassen sich vermindern.

8.1. Protein-Inhibitoren der α -Amylase

Die Protein-Inhibitoren bestehen nur aus natürlich vorkommenden Aminosäuren, die in geringem Umfang glykosiliert sein können und sind keine Substrat-Analoga. Bereits 1933⁽⁸⁴⁾ wurde im Buchweizen ein Inhibitor der Malz- α -Amylase gefunden und als "Sistoamylase" bezeichnet. In Pflanzen wurden inzwischen mehrere Protein-Inhibitoren der α -Amylase entdeckt und seit 1970 eingehender untersucht. Vor zehn Jahren wurden Protein-Inhibitoren auch in Mikroorganismen nachgewiesen. Durch intensive Screening-Programme wurde die weite Verbreitung dieser Verbindungen in Streptomyceten entdeckt. 1981 konnten die ersten Primärstrukturen von Protein-Inhibitoren aus Pflanzen⁽⁸⁵⁾ und Mikroorganismen⁽⁸⁶⁾ aufgeklärt werden. 1985 wurden die Sequenzen von zwei weiteren Inhibitoren mikrobiellen Ursprungs publiziert^(87,88).

Beim Studium der Sequenzen fällt auf, daß nur 17 Aminosäuren identisch sind. Die Homologie beträgt im einzelnen:

Z-2685 - HOE 467 : 33%

Z-2685 - Haim II : 42%

HOE 467 - Haim II : 32%

Trotz Ähnlichkeiten in der Wirkung zeigen die Protein-Inhibitoren mikrobiellen Ursprungs keine Sequenz-Homologie zu denen aus Pflanzen.

Für die vier Inhibitoren wurde ein Stammbaum nach der maximum parsimony Methode (Theorie siehe 7.4.) berechnet. In Abb.49 ist an den Verzweigungen die Zahl der minimalen Nukleotidaustausche angegeben.

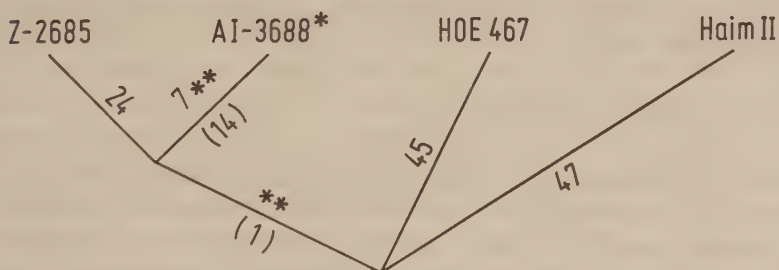


Abb.49: Stammbaum der α -Amylase-Inhibitoren aus Streptomyceten berechnet nach der maximum parsimony Methode.

* : AI-3688 besteht aus nur 36 Aminosäuren, während die anderen drei Inhibitoren aus über 70 Resten aufgebaut sind.

** : Um die Zahlen der minimalen Nukleotidaustausche vergleichen zu können, müssen die Werte, die mit zwei Sternchen versehen sind, mit dem Faktor 2 multipliziert werden (entspricht den Angaben in Klammern).

Bei den nachfolgenden Betrachtungen wird der Inhibitor AI-3688⁽⁸⁸⁾ nicht berücksichtigt, da er nur aus 36 Aminosäuren aufgebaut ist, wobei Ring B fehlt. Da aber auch der verkürzte Inhibitor, ohne Ring B, die α -Amylasen der Säuger hemmt, folgt, daß Ring A für die Funktion von essentieller Bedeutung ist.

8.3. Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor

Die bei allen Inhibitoren entdeckte Sequenz Trp-Arg-Tyr ist nach den Ergebnissen der gerade veröffentlichten Röntgenstruktur-Analyse⁽⁸⁹⁾ von HOE 467 tatsächlich exponiert angeordnet, wie wir schon in der Publikation⁽⁹⁰⁾ und ohne Kenntnis der Röntgenarbeiten postuliert haben. Dies ist unerwartet, da hydrophobe Reste meist im Innern eines Moleküls lokalisiert sind. Die Ringe A und B haben die Funktion, diese Struktur zu ermöglichen. Dies erklärt das Verschwinden der inhibitorischen Wirkung bei Reduktion der Disulfidbrücken.

8.3.1. Bildung des Komplexes

Die Seitenketten von Trp-Arg-Tyr scheinen an der Hemmung der α -Amylase beteiligt zu sein. Es wurde deshalb versucht, das Amylasemolekül nach möglichen Partnern abzusuchen, die mit diesen Aminosäuren interagieren könnten. Wichtige Anregungen lieferte die Arbeit von Burley und Petsko⁽⁹¹⁾. Die Autoren untersuchten Faktoren, die die Struktur von Proteinen stabilisieren könnten. Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen (Salzbrücken) und Van-der-Waals-Kräfte waren bereits bekannt.

Als vierter Faktor kommt die sog. Aromaten-Aromaten-Wechselwirkung zwischen aromatischen Wasserstoffatomen und den π -Elektronen hinzu, welche z.B. Perutz⁽⁹²⁾ unter anderem für die Bindung von Benzafibrat, Ethacrinsäure und Succinyl-L-Tryptophan-L-Tryptophan an Sichelzell-Hb verantwortlich macht.

Diese Befunde lassen sich auf die Bindung zwischen Inhibitor und Enzym übertragen; als Gegenstück zur Sequenz Trp-Arg-Tyr des Inhibitors bietet sich die Sequenz Phe-Glu-Trp am N-Terminus der

pankreatischen Schweine- α -Amylase an (siehe Abb.50). Die Aromaten-Aromaten-Wechselwirkung liegt hier zwischen Phe-Trp und Trp-Tyr vor; hinzu kommt eine Salzbrücke zwischen Glu und Arg. Die hydrophobe Umgebung in diesem Bereich der α -Amylase ermöglicht eine zusätzliche Stabilisierung des Komplexes durch Van-der-Waals-Kräfte.

8.3.2. Tertiärstruktur der Säuger- α -Amylasen

Zur besseren Vorstellung der Geometrie des Komplexes muß auf die Raumstruktur der pankreatischen Schweine- α -Amylase eingegangen werden, die aber nur in Abrissen aufgeklärt ist. Das Endoenzym besitzt nach Buisson⁽⁹³⁾ eine ähnliche Faltung wie die Taka-Amylase aus *aspergillus oryzae*, deren Strukturanalyse 1984 durchgeführt wurde⁽⁹⁴⁾. Eine ca. 30 Å⁰ lange Spalte, an deren Ende sich die N-terminale Sequenz befindet, durchzieht das Enzym. Während der Hydrolyse der glykosidischen Bindung der Stärke befinden sich ca. sieben Glucoseeinheiten innerhalb dieser Spalte. Man kann sich vorstellen, daß der Inhibitor durch die Bindung an die α -Amylase den Zugang zu dieser Spalte sterisch versperrt; somit sind die katalytischen Zentren innerhalb der Spalte dem natürlichen Substrat nicht mehr zugänglich. Die Beobachtung, daß sich Wirkzentren von Enzymen häufig in hydrophober Umgebung befinden, mag ein Hinweis sein, daß es sich bei der N-terminalen Sequenz der α -Amylase um das oder eines der aktiven Zentren handelt, an das der Inhibitor bindet.

Die Sequenz Phe-Glu-Trp findet man bei allen bisher bekannten Säuger- α -Amylasen, nicht dagegen bei bakteriellen Amylasen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, daß der Inhibitor nur die Enzyme der Säuger hemmt⁽³⁷⁾.

Die Hypothese muß überprüft werden, am besten durch Analyse der Raumstruktur des Inhibitor-Enzym-Komplexes. Weiter bietet sich die Möglichkeit, das Amylase-Gen zu klonieren und bestimmte Bereiche der DNA, die z.B für den N-Terminus oder den C-Terminus der α -Amylase codieren, zu deletieren. Die Hemmkinetik gegenüber den veränderten α -Amylasen könnte wertvolle Erkenntnisse liefern.

8.4. Homologie zwischen Inhibitor und Enzym

Untersuchungen am Inhibitor der Phospholipase aus dem Gift der Bulgarischen Viper⁽⁹⁵⁾ zeigten, daß seine Sequenz zu etwa 52% mit der des Enzyms homolog ist. Dieser überraschende Befund wurde als Genduplikation des Urgens der Phospholipase gedeutet. Da es sich um das Enzym eines Reptils handelt, standen zur Evolution nur ca. 280 Millionen Jahre zur Verfügung; daher war die Homologie sehr groß und erkennbar.

Mit Hilfe des Computer-Programmes RELATE⁽⁹⁶⁾ wurde die Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685 mathematisch ausgewertet. Das Molekül besitzt keine intern repetitiven Sequenzen. Beim Vergleich mit der pankreatischen Schweine- α -Amylase wurden am N-Terminus völlig unerwartet 25 Aminosäuren entdeckt, die in acht Positionen mit der Inhibitor-Sequenz übereinstimmten. Die Homologie zwischen Schweine- α -Amylase und Z-2685 beträgt hier auf Proteinebene ca. 32%, auf DNA-Ebene ca. 60%. Die Werte für HOE 467, Haim II und AI-3688 sind vergleichbar. Wie Abb. 50 zeigt, hat das Computer-Programm die übrigen Bereiche der Sequenz von Z-2685 auseinandergezogen, um maximale Homologie zu erreichen. Hier konnte keine sinnvolle Übereinstimmung festgestellt werden, insbesondere auch deshalb, weil die Zuordnung der Reste von HOE 467 und Haim II abweichende Ergebnisse lieferte.

	Pos.																										Pos.
Human pancr.	20-N	T	Q	Q	G	R	T	S	I	V	H	L	F	E	W	G	W	V	D	I	A	L	E	C	E	R	Y-46
Human Speichel	20-N	T	Q	Q	G	R	T	S	I	V	H	L	F	E	W	R	W	V	D	I	A	L	E	C	E	R	Y-46
Schwein pancr.	5-Q	T	Q	S	G	R	T	D	I	V	H	L	F	E	W	R	W	V	D	I	A	L	E	C	E	R	Y-31
Ratte pancr.	15-H	T	A	D	G	R	T	A	I	V	H	L	F	E	W	R	W	A	D	I	A	K	E	C	E	R	Y-41
gemeinsam		T			G	R	T		I	V	H	L	F	E	W												

Abb.51: Vergleich der N-terminalen Sequenz der α -Amylasen von Schwein (pankreatisch)⁽⁹⁷⁾, Human (Speichel und pankreatisch)⁽⁹⁸⁾ und Ratte (pankreatisch)⁽⁹⁹⁾.

Der Sequenz F E W, die mit einem Kästchen versehen ist, wird eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit dem Inhibitor zugeschrieben. Hier liegt vermutlich das oder eines der aktiven Zentren des Enzyms.

Der N-terminale Bereich von 25 Aminosäuren ist, wie in Abb.51 gezeigt wird, bei den Säuger- α -Amylasen sehr stark konserviert.

8.5. Inhibitor : Produkt einer Genduplikation des eigenen Enzyms

Die in 8.3. formulierte Hypothese kann durch das in 8.4. dargelegte Ergebnis weiter präzisiert werden: der Inhibitor bindet an den Teil der α -Amylase, zu dem er selbst homolog ist. Die Entstehung des Rings A der Inhibitoren kann man sich so vorstellen: das Amylase-Gen oder ein Bereich desselben wurde vor Hunderten von Millionen Jahren dupliziert. Das eine Gen persistierte als Enzym, das zweite mutierte zum Inhibitor. Während der Evolution wurde der Bereich dieses duplizierten Gens, der für die Sequenz des Ringes A des Inhibitors codiert, stark konserviert, während sich diejenigen Regionen des Gens, welche für die Sequenz der restlichen Aminosäuren des Inhibitors codieren, stärker veränderten. Dies war notwendig, um die neue Aufgabe, die Sequenz Trp-Arg-Tyr des Ringes A in die exponierte Konformation zu bringen (siehe 8.3.), erfüllen zu können. Daher lassen sich heute keine Homologien mehr in diesem Bereich der Inhibitor-Sequenz feststellen.

Die geringe Mutationsrate der N-terminalen Sequenz mag ein Hinweis sein, daß dieser Teil der α -Amylase von funktioneller Bedeutung ist; es wurde beobachtet, daß Bereiche von Molekülen, die an eine bestimmte Funktion angepaßt sind, wie die aktiven Zentren von Enzymen, die Hämkontakte von Hämoglobinen oder die Mononukleotid-Falte von Enzymen, die als Coenzym NAD, FMN oder AMP benötigen, dem Selektionsdruck sehr viel weniger ausgesetzt sind; ihre Mutationsrate ist deshalb deutlich geringer⁽¹⁰⁰⁾.

8.6. Genetik und Evolution der α -Amylasen

Zum besseren Verständnis der Vorgänge auf DNA-Ebene wird im folgenden die Genetik der α -Amylasen kurz zusammengefaßt.

Das α -Amylase Gencluster des Menschen befindet sich auf Chromosom 1, das der Maus auf Chromosom 3. Bei beiden wurden zwei distinkte, hintereinander angeordnete Amylase-loci entdeckt (Abb.52)



Abb.52: α -Amylase-loci der Maus^(101,102)

Amy 1 : codiert für die Speichel- und Leber- α -Amylase

Amy 2 : codieren für die pankreatische α -Amylase

Jeder Locus enthält multiple Allele; überdies sorgen post-translatorische Modifikationen für die Bildung von Isoenzymen. Jedes der Gene wird durch mehrere Introns (bei der Maus zehn) unterteilt und besitzt eigene regulatorische Sequenzen.

Beide Loci werden gewebsspezifisch exprimiert, wobei bei Amy 2 zusätzlich ein Hormoneffekt⁽¹⁰³⁾ existiert : durch Insulin und Glucocorticoide kommt es zu einem dramatischen Anstieg der α -Amylase im Pankreas.

Die Charakteristika erinnern an das Gencluster der α - und β -Globine (siehe 7.1.). Ein wichtiger Unterschied ist, daß die Globin-Gene während der Ontogenie des Organismus verschieden exprimiert werden (Übergang von embryonalem zu fötalem und adultem Hb), ein Effekt, der bei den α -Amylase-Genen nicht zu beobachten ist.

Vor ca. 400 Millionen Jahren wurde das Urgen der α -Amylase dupliziert⁽¹⁰²⁾, wodurch die Loci Amy 1 und Amy 2 resultierten (während derselben Zeit wurden die α - und β -Globin-Gene auf verschiedene Chromosomen verteilt). Innerhalb der letzten 30 Millionen Jahre wurde nur Amy 2 mehrfach dupliziert⁽¹⁰⁴⁾, so daß heute bei der Maus multiple Amy 2 Gene und ein Pseudogen

vorliegen. Während der langen Evolutionsdauer wurde die enge Nachbarschaft auf den Chromosomen beibehalten. Dadurch besteht ein permanentes Potential, die Sequenzen durch Genkonversion gegeneinander zu korrigieren. Deshalb ist die Homologie beider Amylase-Gene (Amy 1 und 2) innerhalb eines Organismus viel höher als zwischen denen verschiedener Spezies. Bei den Globinen wird Genkonversion⁽¹⁰⁵⁾ für die Gene der α_1 -, α_2 - und γ -, λ -Ketten postuliert.

8.7. Biologische Funktion des Inhibitors

Es stellt sich die Frage, welche Funktion der Inhibitor bei Streptomyceten besitzt. Man könnte an ein Signalpeptid denken. Allerdings erfüllt keiner der Inhibitoren die nötigen Kriterien, die an die Primärstruktur gestellt werden⁽¹⁰⁶⁾. Möglicherweise greift der Inhibitor regulatorisch in den Stärkeabbau ein, indem er die α -Amylase von Streptomyceten hemmt. Das ist aber noch nicht nachgewiesen worden.

Auf jeden Fall spielen Inhibitoren, die im Organismus von Säugern natürlich vorkommen, eine wesentliche Rolle in der Steuerung der Enzymaktivität (neben der Kontrolle auf DNA-Ebene und durch Effektoren bei allosterischen Enzymen), wie die verschiedenen Trypsin-Inhibitoren (z.B. $\alpha 1$ Antitrypsin) oder Antithrombin III bei der Kaskade der Blutgerinnung⁽¹⁰⁷⁾.

Pflanzliche α -Amylase-Inhibitoren werden vor allem während der Keimung gebildet und dienen dem Samen als Schutz vor Mikroorganismen und Insekten (ca. 65% des Weizenalbumins ist Inhibitorprotein⁽¹⁰⁸⁾).

E : Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Primärstruktur der Hämoglobine von Großem Panda (*Ailuropoda melanoleuca*), Kleinem Panda (*Ailurus fulgens*), Kragen- (*Ursus tibetanus*) und Malaienbär (*Helarctos malayanus*) wurde aufgeklärt.
2. Das Blut adulter Bären enthält nur eine Hämoglobin-Komponente. Die Ketten wurden durch Ionenaustausch-Chromatographie (CM-Cellulose) und HPLC (reversed phase C_4 -Material) getrennt und Peptide sequenziert.
3. Die Hämoglobine von Kragen- und Malaienbär sind identisch. Beide sind nah verwandt, ähnlich wie Mensch, Schimpanse und Bonobo.
Die heute bekannten Beispiele identischer Ketten von Hämoglobinen werden in einer Tabelle zusammengefaßt.
4. Der Blutfarbstoff des Großen Panda weicht überraschenderweise stark von denen des Kragen- und Malaienbär ab (11 Unterschiede), weist aber zu dem des Kleinen Panda nur sechs Austausche auf.
5. Die mathematische Auswertung der Sequenzdaten erlaubt die Aufstellung eines biochemischen Stammbaumes der Raubtiere. Großer und Kleiner Panda müssen demnach in eine eigene Familie eingereiht werden, die sich von der Linie der Groß- und Kleinbären abgetrennt hat. Ihre Stellung gegenüber Katzen, Hunden, Mardern und Robben wird angegeben.
6. Die Befunde wurden mit paläontologischen Daten und den Ergebnissen der DNA-Hybridisierung verglichen und diskutiert.

7. Die Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Z-2685 (76 Aminosäuren) aus *Streptomyces parvullus* wird beschrieben. Der Inhibitor ist gegenüber enzymatischem Abbau weitgehend resistent. Das Molekül wurde deshalb oxidativ denaturiert und mit Trypsin gespalten. Zur Bestimmung der Disulfidbrücken wurde der native Inhibitor bei erhöhter Temperatur mit Thermolysin gespalten.
8. Die Sequenzen der vier bekannten α -Amylase-Inhibitoren aus Streptomyceten werden miteinander verglichen und ein Stammbaum wurde aufgestellt.
9. Der Inhibitor enthält zwei Disulfidringe. Ring A zeigt eine hydrophobe Sequenz Trp-Arg-Tyr, deren Seitenketten sich in der Mitte von Ring A befinden. Diese Sequenz wird als möglicher Teil des aktiven Zentrums des Inhibitors betrachtet. Die Bindung zwischen Inhibitor und Enzym wird postuliert durch Aromaten-Aromaten-Wechselwirkung zwischen zwei Dreier-Sequenzen (Trp-Arg-Tyr des Inhibitors und Phe-Glu-Trp der α -Amylase). Durch die Bindung des Inhibitors an das Enzym sind die aktiven Zentren innerhalb einer 30 Å⁰ langen Spalte für das Substrat Stärke nicht mehr zugänglich.
10. Die mathematische Auswertung der Sequenz erbrachte eine überraschende Homologie zwischen Ring A des Inhibitors und dem N-terminalen Bereich von Säuger- α -Amylasen. Sie wird gedeutet als Genduplikation des Urgens der α -Amylase, wobei ein Gen als Enzym persistierte, während das andere zum Inhibitor mutierte. Genetische Aspekte der Säuger- α -Amylasen werden erörtert.
11. Die Möglichkeit der therapeutischen Anwendung des Inhibitors bei Diabetes mellitus wird besprochen.

F : L I T E R A T U R

- (1) Cannan R.K.,
(1961) Science 127, 1376-1378.
- (2) Rossi-Fanelli A. & Antonini E.
(1958) Biochim. Biophys. Acta 30, 608-615.
- (3) Teale F.W.J.
(1959) Biochim. Biophys. Acta 35, 543.
- (4) Clegg G.B., Naughton M.A. & Weatherall D.J.
(1966) J. Mol. Biol. 19, 91-108.
- (5) Davis B.J.
(1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- (6) Rovera G., Magarian C., Borun T.W.
(1978) Anal. Biochem. 85, 506-518.
- (7) Hirs C.H.W., Moore S., Stein W.H.
(1956) J. Biol. Chem. 219, 623-642.
- (8) Guidotti G., Hill R.J., Konigsberg W.
(1962) J. Biol. Chem. 237, 2184.
- (9) Jauregui-Adell J. & Marti J.
(1975) Anal. Biochem. 69, 468-473.
- (10) Kratzin H., Yang C., Krusche J.U., Hilschmann N.
(1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1591-1598.
- (11) Moffat E.D., Lyle R.F.
(1959) Anal. Chem. 31, 926.
- (12) Gottlieb A.J., Itano H.A.
(1963) Bioc. Biop. R. 12, 405.
- (13) Dagliesh C.E.
(1952) Biochem. J. 52, 3.
- (14) Frank H., Petersen H.
(1955) Z. physiol. Chem. Hoppe-Seyler 299, 1.
- (15) Spackman D.H., Stein W.H., Moore S.
(1958) Anal. Chem. 30, 1190-1206.
- (16) Tsugita A., Scheffler J.J.
(1982) Eur. J. Biochem. 124, 585-588.
- (17) Matsubara H., Sasaki R.M.,
(1969) Biochim. Biophys. Res. Commun 35, 175-181.

- (18) Oeding V., Neubauer H., Vertesy L., Weidenmüller H.L.
(Hoechst AG) Ger. Offen.2,716,050 Appl.9.Apr.1977
(Chem. Abstr. 90, 4438e (1979)).
- (19) Meyer T.S., Lamberts B.L.
(1965) Biochim.Biophys.Acta 107, 144-145.
- (20) Toennies G., Kolb J.J.
(1951) Anal. Chem. 23, 823-826.
- (21) Königsberg W., Goldstein J., Hill R.J.
(1963) J. Biol. Chem. 238, 2028.
- (22) Matsubara H., Sasaki R.M.
(1968) J. Biol. Chem. 243, 1732.
- (23) Marcus F.
(1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 542-546.
- (24) Akabori S., Ohno K., Narita K.
(1952) Bull. Chem. Soc. Jpn. 25, 214-218.
- (25) Seibl J.
(1970) Massenspektrometrie, Akad. Verl. Ges., Frkf./M.
- (26) Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N.
(1981) Nature 293, 270.
- (27) Edman P. & Begg G.
(1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91.
- (28) Begg G., Rücknagel P., Braunitzer G., Schuster W.
(1986) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 81-82.
- (29) Braunitzer G., Schrank B., Stanql A. & Scheithauer U.
(1978) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 137-146.
- (30) Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A., Petersen S., Petersen U.,
(1971) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 1730-1732.
- (31) Braunitzer G., Schrank B.
(1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 417.
- (32) Pflutschinger J. & Braunitzer G.
(1980) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 925-931.
- (33) Tarr G.E., Beecher J.F., Bell M., McKean D.J.
(1978) Anal. Biochem. 84, 622-627.
- (34) Zimmermann C.L. & Pisano J.J.
(1977) Meth. Enzymol. 47, 45-51.
- (35) Lottspeich F.
(1980) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 1829-1834.

- (36) Braunitzer G., Gehring-Müller R., Hilschmann N., Hilse K., Hobom G., Rudolff V. & Wittmann-Liebold B.
(1961) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 283-286.
- (37) Vertesy L., Oeding V., Bender R., Zepf K., Neesemann G.
(1984) Eur. J. Biochem. 141, 505-512.
- (38) Truscheit E., Frommer W., Junge B., Müller L., Schmidt D.D., Wingender W.
(1981) Angew. Chem. 93, 738-755.
- (39) Titani K., Hermodson M.A., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H.
(1972) Nature 238, 35.
- (40) Perutz M.F.
(1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 327-386.
- (41) Benesch R., Benesch R.A.
(1967) Biochem. Biophys. Res. Comm. 26, 162-167.
- (42) Fermi G., Perutz M.F., Shaanan B.
(1984) J. Mol. Biol. 175, 159-174.
- (43) Fermi G.
(1975) J. Mol. Biol. 97, 237-256.
- (44) Bunn H.F.
(1971) Science 172, 1049-1050.
- (45) Braunitzer G.
(1980) Klin. Wschr. 58, 701-708.
- (46) Braunitzer G., Jelkmann W., Stangl A., Schrank B., Krombach C.
(1982) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 683-691.
- (47) Braunitzer G., Stangl A., Schrank B., Krombach C., Wiesner H.
(1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 743-749.
- (48) Watson-Williams E.J., Beale D., Irvine D., Lehmann H.
(1965) Nature 205, 1273-1276.
- (49) David A.
(1869) Nouv. Archs. Mus. Hist. nat., Paris 5, 12-18.
- (50) Davis D.
(1964) The Giant Panda: a morphological study of evolutionary mechanisms. Fieldiana Zool. Mem. 3 (Chicago Natural History Museum)
- (51) Morris D.
(1982) The Giant Panda Penguin Books, New York.
- (52) Ewer R.F.
(1973) The Carnivores, Cornell University Press, N.Y.

- (53) Eisenberg J.F.
(1981) The mammalian radiations. An analysis of trends in evolution adaption and behaviour, University of Chicago Press.
- (54) Thenius E.,
(1979) Z. für Säugetierkunde 44, 286-305.
- (55) O'Brien S.J., Nash W.G., Wildt D.E., Bush M.E., Benveniste R.E.
(1985) Nature 317, 140-144.
- (56) Sarich V.
(1973) Nature 245, 218-220.
- (57) Goodman M., Tashian R.E.
(1976) Molecular Anthropology, Plenum Press N.Y., 321-353.
- (58) Goodman M.
(1982) Macromolecular Sequences in Systematic and Evolutionary Biology, Plenum Press N.Y.
- (59) Hardison R.C., Sawada I., Cheng J.-F., Shen C.-K.J., Schmid C.W.
(1986) Nucleic Acids Research 14, 1903-1911.
- (60) Wainscoat J.S., Hill A.V.S., Boyce A.L., Flint J., Hernandez M., Thein S.L., Old J.M., Lynch J.R., Falusi A.G., Weatherall D.J., Clegg J.B.
(1986) Nature 319, 491-493.
- (61) Zuckerkandl E., Pauling L.
(1962) Horizons in Biochemistry (Kasha M., Pullman B., eds.),
- (62) Goodman M., Moore W., Matsuda G.
(1975) Nature 253, 603-608.
- (63) Kimura M.
(1982) Molecular Evolution, Protein Polymorphism and the Neutral Theory (M. Kimura, ed.) Japan Scientific Societies Press.
- (64) Wilson A.C., Carlson S.S., White T.J.
(1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 573-639.
- (65) Brimhall B., Stangland K., Jones R.T., Becker R.R., Bailey T.J.
(1978) Hemoglobin 2, 351-370.
- (66) Thenius E.
(1969) Phylogenie der Mammalia (Thenius E. ed.)
Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- (67) Hofmann O., Schreitmüller T., Braunitzer G., Wiesner H.
(1986) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 53-59.
- (68) Pocock R.I.
(1921) Proc. Zool. Soc. 1921, 389-422.

- (69) Goodman M., Czelusniak J., Moore G.W., Romero-Herrera A.E., Matsuda G.
(1979) Syst. Zool. 28, 132-163.
- (70) Moore G.W., Barnabas J., Goodman M.
(1973) J. Theor. Biol. 38, 459-485.
- (71) Fitch W.M., Margoliash E.
(1967) Science 155, 279-284.
- (72) Goodman M.
(1981) Prog. Biophys. Mol. Biol. 37, 105-164.
- (73) Tagle D.A., Miyamoto M.M., Goodman M., Hofmann O., Braunitzer G., Gölthenboth R., Jalanka H.
(1986) Naturwissenschaften, im Druck.
- (74) Goodman M., Braunitzer G., Stangl A. & Schrank B.
(1983) Nature 303, 546-548.
- (75) Schröder W.A., Shelton J.R., Shelton J.B., Cormick J., Jones R.T.
(1963) Biochemistry 2, 992-1008.
- (76) de Jong W.W.W.
(1971) Biochim. Biophys. Acta 251, 217-226.
- (77) Braunitzer G., Schrank B., Stangl A., Wiesner H.
(1980) J. Chem. Soc. Pak. 2, 1-7.
- (78) Kleinschmidt T. et al.
(1986) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367, 153-160.
- (79) Lalthantluanga R., unveröffentlichte Ergebnisse
- (80) Oberthür W. et al.
(1982) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 363, 777-787.
- (81) Hiebl I. unveröffentlichte Ergebnisse
- (82) Goodman M., Braunitzer G., Kleinschmidt T., Aschauer H.
(1983) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 364, 205-217.
- (83) Kleinschmidt T. unveröffentliche Ergebnisse
- (84) Chrzaszcz T., Janicki J.
(1933) Biochem.Z. 260, 354 und 264, 193.
- (85) Kashlan N., Richardson M.
(1981) Phytochemistry 20, 1781-1784.
- (86) Aschauer H., Vertesy L., Braunitzer G.
(1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 465-467.

- (87) Murai H., Hara S., Ikenaka T., Goto A., Arai M., Murao S.
(1985) J. Biochem. 97, 1129-1133.
- (88) Vertesy L., Tripier D.
(1985) Febs Lett. 185, 187-190.
- (89) Pflugrath J.W., Wiegand G., Huber R., Vertesy L.
(1986) J. Mol. Biol. 189, im Druck
- (90) Hofmann O., Vertesy L., Braunitzer G.
(1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 1161-1168.
- (91) Burley S.K., Petsko G.A.
(1985) Science 229, 23-28.
- (92) Perutz M.F., Fermi G., Abraham D.J., Poyart C., Bursaux E.
(1986) J. Am. Chem. Soc. 108, 1064-1078.
- (93) Buisson G., Duee D.R.F., Haser R., Payan F.
(1984) Acta Crystallogr. Sect. A 40, C-38 (suppl.)
- (94) Matsuura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M.
(1984) J. Biochem. 95, 697-702.
- (95) Mancheva I., Kleinschmidt T., Aleksiev B., Braunitzer G.
(1984) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 885-894.
- (96) George D.G., Orcutt B.C., Dayhoff M.O., Barker W.C.
(1985) PIR Report REL-0185, Version 2.0, Natl. Biomed. Res. Found., Georgetown Univ. Med. Center, Washington, DC. Academic Press, New York, 189-225.
- (97) Pasero L., Mazzei-Pierron Y., Abadie B., Chicheportiche Y., Marchis-Mouren G.
(1986) Biochim. Biophys. A. 869, 147-157.
- (98) Nakamura N., Ogawa M., Nishide T., Emi M., Kosaki G., Himeno S., Matsubara K.
(1984) Gene 28, 263-270.
- (99) MacDonald R.J., Crerar M.M., Swain W.F., Pictet R.L., Thomas G., Rutter W.J.
(1980) Nature 287, 117-122.
- (100) Doolittle R.F.
(1985) Spektrum d. Wiss. Dez., 78-88.
- (101) Meisler M., Strahler J., Wiebauer K., Thomsen K.K.
(1983) Isoenzymes: Curr. Top. Biol. Med. Res. 7, 39-57.
- (102) Wiebauer K., Gumucio D.L., Jones J.M., Caldwell R.M., Hartle H.T., Meisler M.
(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 5446-5449.

- (103) Korc M., Owerbach D., Quinto C., Rutter W.J.
(1981) Science 213, 351-353.
- (104) Gumucio D.L. et al.
(1985) J. Biol. Chem. 260, 13483-13489.
- (105) Liebhaber S.A., Goossens M., Kan Y.W.
(1981) Nature 290, 26-29.
- (106) Vlasuk G.P., Inouge S., Ito H., Itakura K., Inouye M.
(1983) J. Biol. Chem. 258, 7141-7148.
- (107) Tschesche H.
(1974) Angew. Chem. 86, 21-40.
- (108) Petrucci T., Tomasi H., Cantagalli P.
(1974) Phytochemistry 13, 2487.

LEBENS LAUF

27.11.57

Geboren in München als Sohn des Regierungsrats Ottmar Hofmann und dessen Ehefrau Irmengard, geb. Leipfinger

1964-1968

Besuch der Volksschule an der Schwindstr. in München

1968-1977

Besuch des mathematisch naturwissenschaftlichen Gisela-Gymnasiums in München

Mai 1977

Abschluß des Gymnasiums mit der Abiturprüfung

November 1977 - März 1979

Ableistung des Zivildienstes an der Radiologischen Universitäts-Klinik in München bei Prof. Lissner

Mai 1979 - Dezember 1983

Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

April 1981

Vorexamen für Lebensmittelchemiker

Dezember 1983

Abschluß des Studiums mit der 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Seit Januar 1984

Promotion in der Proteinchemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried b. München bei Prof. Braunitzer

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Zeit von Januar 1984 bis Mai 1986 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer für die Ermöglichung der Arbeit, für seine Unterstützung und für wertvolle Diskussionen und Ratschläge.

Herrn Dr. L. Vertesy danke ich für die freundliche Überlassung des α -Amylase-Inhibitors.

Für die Bereitstellung der Erythrozyten danke ich Herrn Dr. H. Wiesner, Herrn Dr. R. Gölthenboth und Herrn Dr. H. Jalanka.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie bin ich für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Für die Arbeiten am Massenspektrometer möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Schäfer, für die Durchführung des ^1H -NMR Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler danken.

Für die Durchsicht der Arbeit danke ich herzlich Frl. I. Hiebl.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

